

PCT COOPERATION TRL Y

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C. 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 22 February 2000 (22.02.00)	
International application No. PCT/EP99/04014	Applicant's or agent's file reference 991233woMegn
International filing date (day/month/year) 10 June 1999 (10.06.99)	Priority date (day/month/year) 10 June 1998 (10.06.98)
Applicant BOSIO, Andreas et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
08 January 2000 (08.01.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer C. Villet Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

THIS PAGE BLANK (USPTO)

09/701584
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

10

Applicant's or agent's file reference 991233woMehg		FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP99/04014	International filing date (day/month/year) 10 June 1999 (10.06.99)	Priority date (day/month/year) 10 June 1998 (10.06.98)	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12Q 1/68			
Applicant MEMOREC MEDICAL MOLECULAR RESEARCH COLOGNE STOFFEL GMBH			

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 4 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☒ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

RECEIVED

MAR 23 2001

TECH CENTER 1600/2900

Date of submission of the demand 08 January 2000 (08.01.00)	Date of completion of this report 05 September 2000 (05.09.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/04014

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

☐ the international application as originally filed.

☒ the description, pages 1-19, as originally filed,
pages _____, filed with the demand,
pages _____, filed with the letter of _____,
pages _____, filed with the letter of _____.

☒ the claims, Nos. _____, as originally filed,
Nos. _____, as amended under Article 19,
Nos. _____, filed with the demand,
Nos. 1-10, filed with the letter of 15 April 2000 (15.04.2000),
Nos. _____, filed with the letter of _____.

☒ the drawings, sheets/fig 1/7-7/7, as originally filed,
sheets/fig _____, filed with the demand,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages _____

☐ the claims, Nos. _____

☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 99/04014

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-10	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-10	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-10	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

NOVELTY & INVENTIVE STEP:

1. In examining the inventive step of the amended Claims 1-8 and 10, Nucleic Acids Research, Vol. 22(24), 11 December 1994, pages 5456-5465 (D2) appears to be the closest prior art.

D2 describes the analysis of genetic polymorphisms using oligonucleotide samples immobilised on a solid phase of glass, and fluorescence. Immobilisation is achieved using 3-aminopropyl trimethoxysilane and 1,4-phenylene diisothiocyanate. The immobilised DNA oligomer is 15 bp long and is bonded to the isothiocyanate group by a dT spacer with 15 nucleotides and (CH₂)₆ for hybridisation. The polynucleotides to be analysed are marked with fluorescence.

The subject matter of Claims 1-7 and 10 differs from D2 only in that the immobilised nucleic acids are between 200 and 600 bp long.

The description of the present application indicates the advantages of using nucleic acids of this length. Firstly, a non-redundant hybridisation is

THE PAGE BLANK

ensured with a high degree of reliability. Secondly, all known cDNAs can be bonded to the solid phase as whole cDNAs or as fragments thereof.

However, to a person skilled in the art wanting to produce an array for determining gene expression, it is clear that longer nucleic acids are used in such an array. Bioessays, Vol. 18, pages 427-431 (1996) (D3) describes the use of microarrays in determining gene expression. The immobilised polynucleotides are cDNAs which code for a whole gene. Since the length of the cDNAs varies considerably and there are, as the applicants show, cDNAs which are 200 bp long, it would also be obvious to a person skilled in the art to immobilise cDNAs which are between 200 and 600 bp long. Furthermore, US-A-5 688 642 (D1) shows that the immobilisation of nucleic acids up to 400 bp long is entirely within the routine scope of activity of a person skilled in the art.

To this person skilled in the art seeking to achieve an improvement in the immobilisation of nucleic acids over D3, it would be obvious to use the method described in D2 as very specific. The carrier as per Claims 1-7, its use as per Claim 8 and the production as per Claim 10 are therefore seen as obvious solutions to the problem.

2. The method as per Claim 9 differs from D3 only in that it explicitly mentions the use of nucleic acids between 200 and 600 bp long. As described above, however, the Examining Authority is of the opinion that it would be obvious to a person skilled in the art to use the method described in D3 to immobilise cDNAs of this length as well. Therefore, Claim 9 is

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 99/04014

not considered to be inventive either.

INDUSTRIAL APPLICABILITY:

3. The subject matter of the application is considered industrially applicable.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 99/04014

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

1. Contrary to PCT Rule 5.1(a)(ii), the description does not indicate the relevant prior art disclosed in documents D1 and D3 and does not cite those documents.

THIS PAGE BLANK (uspto)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 99/04014

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. The wording "composed principally of silicon oxide" in Claim 3 defines the substrate in a vague manner and therefore is not suitable for defining the subject matter of the application.
2. Claim 5 does not state clearly whether "Nu" can be nucleophilic groups other than -NH₂ and -NHR.
3. The functional groups mentioned in Claim 7 are all defined very broadly. Therefore, not all compounds containing these groups can be used in the substrate as per the invention. Consequently, Claim 7 is not supported adequately by the description.
4. The immobilisation method has been omitted from Claim 9, which therefore appears to be based on a different inventive concept to the remaining claims.
5. The description appears to contradict itself. Page 3 advises against the use of complete cDNAs, whilst page 7 mentions that cDNAs which are 200 bp long are known.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 991233woMegg	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 99/ 04014	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 10/06/1999	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 20/06/1998
Anmelder MEMOREC et al.		

Dieser Internationale Recherchenbericht wurde von der internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser Internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der Sprache ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 36.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 3d

☒ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ keine der Abb.

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

THIS PAGE BLANK (uspto)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 11 SEP 2000

WIPO

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 991233woMehg	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/04014	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 10/06/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 10/06/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12Q1/68		
Anmelder MEMOREC et al.		



1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

 Diese Anlagen umfassen insgesamt 4 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 08/01/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 05.09.2000
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Knudsen, H Tel. Nr. +49 89 2399 8696 

THIS PAGE BLANK (user)

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/04014

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage *(Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.)*:

Beschreibung, Seiten:

1-19 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-10 eingegangen am 15/04/2000 mit Schreiben vom 13/03/2000

Zeichnungen, Blätter:

1/7-7/7 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 1-10 Nein: Ansprüche
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche Nein: Ansprüche 1-10
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche 1-10 Nein: Ansprüche

THIS PAGE BLANK (uspro)

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

siehe Beiblatt

THIS PAGE BLANK (user)

PUNKT V:

NEUHEIT & ERFINDERISCHE TÄTIGKEIT:

- 5.1 Für die Prüfung der erfinderischen Tätigkeit der geänderten Ansprüche 1-8 und 10 scheint "Nucleic Acids Research, Bd. 22(24), 11. Dezember 1994, Seiten 5456- 5465" (D2) nächstliegender Stand der Technik zu sein.

D2 beschreibt die Analyse genetischer Polymorphismen mittels Oligonukleotidproben, die auf einer aus Glas bestehenden Festphase immobilisiert sind, und Fluoreszenz. Die Immobilisierung wird durch den Einsatz von 3-Aminopropyl-Trimethoxysilan und 1,4-phenylene diisothiocyanat erreicht. Der immobilisierte DNA-Oligomer hat eine Länge von 15 bp und wird durch einen dT Spacer mit 15 Nukleotide und $(CH_2)_6$ zur Hybridisierung an die Isothiocyanatgruppe gebunden. Die zu analysierenden Polynukleotide sind mit Fluoreszenz markiert.

Gegenüber D2 unterscheidet sich der Gegenstand der Ansprüche 1-7 und 10 nur darin, daß die immobilisierten Nukleinsäuren zwischen 200 und 600 bp lang sind.

In der Beschreibung der vorliegenden Anmeldung werden die Vorteile der Anwendung von Nukleinsäuren mit dieser Länge angegeben. Erstens wird eine nicht redundante Hybridisierung mit einer hohen Sicherheit gewährleistet. Zweitens können alle bekannten cDNAs an die Festphase als ganze cDNAs oder als Fragmente der cDNAs an die Festphase gebunden werden.

Für den Fachmann, der ein Array zur Bestimmung von Genexpression herstellen möchte, ist es jedoch klar, daß in einem solchen Array längere Nukleinsäuren zum Einsatz kommen. "Bioessays, Bd.18, Seiten 427-431, (1996)" (D3) beschreibt den Einsatz von Mikroarrays in der Bestimmung von Genexpression. Die immobilisierten Polynukleotide sind cDNAs, die für ein ganzes Gen kodieren. Da die Länge der cDNAs erheblich variiert und es, wie von der Anmelderin ausgeführt, cDNAs mit einer Länge von 200 bp gibt, wäre es für den Fachmann naheliegend auch cDNAs mit einer Länge zwischen 200 und 600 bp zu immobilisieren. Weiter zeigt US-A-5 688 642 (D1), daß die Immobilisierung von Nukleinsäuren mit einer Länge bis zu 400 bp durchaus für den Fachmann im Bereich des routinemäßigen Handelns liegt.

THIS PAGE BLANK (uspto)

Für den oben genannten Fachmann, der eine im Vergleich zu D3 verbesserte Immobilisierung der Nukleinsäuren erzielen möchte, wäre es naheliegend, das in D2 als sehr spezifisch beschriebene Verfahren einzusetzen. Der Träger gemäß den Ansprüchen 1-7, seine Verwendung gemäß Anspruch 8 und die Herstellung gemäß Anspruch 10 werden daher als naheliegende Lösungen der Aufgabe angesehen.

- 5.2 Das Verfahren gemäß Anspruch 9 unterscheidet sich von D3 nur darin, daß die Anwendung von Nukleinsäuren mit einer Länge zwischen 200 und 600 bp explizit erwähnt wird. Wie oben beschrieben ist die Prüfungsbehörde jedoch der Auffassung, daß es für den Fachmann naheliegend wäre mittels des in D3 beschriebenen Verfahrens auch cDNAs mit dieser Länge zu immobilisieren. Anspruch 9 wird daher auch als nicht erfinderisch erachtet.

GEWERBLICHE ANWENDBARKEIT:

- 5.3 Der Anspruchsgegenstand wird als gewerblich anwendbar angesehen.

PUNKT VII:

- 7.1 Im Widerspruch zu den Erfordernissen der Regel 5.1 a) ii) PCT werden in der Beschreibung weder der in den Dokumenten D1 und D3 offenbarte einschlägige Stand der Technik noch diese Dokumente angegeben.

PUNKT VIII:

- 8.1 Der Wortlaut "hauptsächlich aus Siliziumoxid" in Anspruch 3 definiert den Träger in einer vagen Weise und ist daher für die Definition eines Anspruchsgegenstandes nicht geeignet.
- 8.2 Aus Anspruch 5 geht nicht eindeutig hervor ob "Nu" andere nukleophile Gruppen als $-NH_2$ und $-NHR$ sein kann.
- 8.3 Die funktionellen Gruppen, die in Anspruch 7 genannt werden, sind alle sehr breit definiert. Es sind daher nicht alle Verbindungen, die diese Gruppen beinhalten, die in der erfindungsgemäßen Träger eingesetzt werden können. Anspruch 7 ist daher nicht ausreichend von der Beschreibung gestützt.

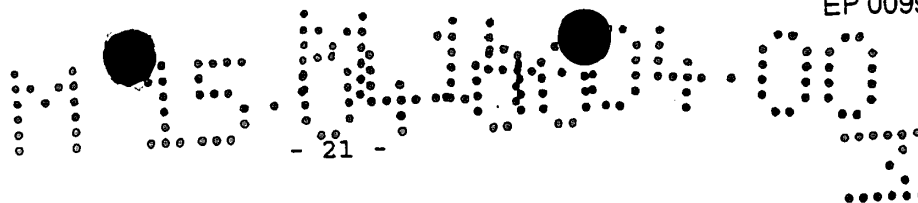
THIS PAGE BLANK (USPTO)

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT - BEIBLATT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/04014

- 8.4 In Anspruch 9 ist das Immobilisierungsverfahren weggelassen, Anspruch 9 scheint daher auf ein anderes erfinderisches Konzept als die übrigen Ansprüche zu basieren.
- 8.5 Die Beschreibung scheint einen inneren Widerspruch zu enthalten. Auf S.3 wird von der Anwendung vollständiger cDNAs abgeraten, während auf S.7 erwähnt wird, daß cDNAs mit einer Länge von 200 bp bekannt sind.

THIS PAGE BLANK (USPTO)



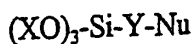
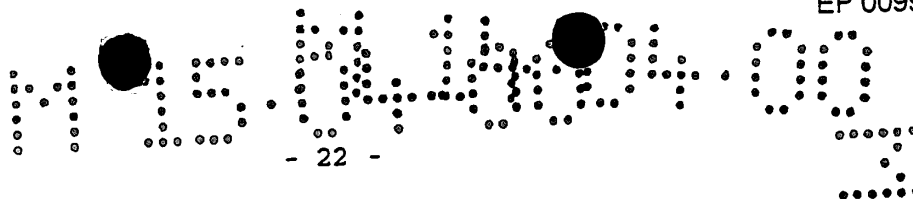
Patentansprüche

1. Träger, an dessen mindestens einer Hauptoberfläche Oligo- oder Polynucleotiden mit dem 5'- oder 3'-Terminus über bifunktionelle Spacer und bifunktionelle Linker kovalent gebunden sind, dadurch gekennzeichnet, daß die mit dem 5'- oder 3'-Terminus über bifunktionelle Spacer und bifunktionelle Linker kovalent gebundenen Oligo- oder Polynucleotiden 200 bis 600 bp aufweisen und der bifunktionelle Linker ausgewählt ist aus der Gruppe starrer homobifunktioneller Linker bestehend aus

1,4-disubstituiertem Benzol, 2,7-substituiertem Fluoren, 2,6-substituiertem Naphtalin, 2,6-substituiertem Anthracen, 2,7-substituiertem Phenanthren, 4,4'-substituiertem Biphenyl, 4,4'-substituierten Benzom ($C_6H_5-CO-CH(OH)-C_6H_5$), 4,4'-substituiertem Benzil ($C_6H_5-CO-CO-C_6H_5$), 4,4'-substituiertem Benzophenon ($C_6H_5-CO-C_6H_5$), 4,4'-substituiertem Diphenylmethan ($C_6H_5-CH_2-C_6H_5$), 4,4'-substituiertem Stilben ($C_6H_5-CH=CH-C_6H_5$), 1,3-substituiertem Allen ($CH_2=C=CH_2$).

2. Träger nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Oligo- oder Polynucleotid RNA, DNA oder PNA ist.
3. Träger nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger aus Glas oder einem anderen hauptsächlich aus Siliziumoxid bestehenden Materials aufgebaut ist.
4. Träger nach Anspruch 1 bis 3, wobei der bifunktionelle Spacer die nachstehende Struktur hat

THIS PAGE BLANK (USPTO)



wobei

$X = C_1-C_3$ Alkyl,

$Y = C_2-C_4$ Alkylen,

Nu = eine nucleophile Gruppe wie $-NH_2$, $-NHR$, mit

$R = -CH_2-CH_2-NH_2$, $-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-NH_2$, $-CO-NH_2$, oder SH , ist.

5. Träger nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der Spacer $Me_3OSi-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2$ ist.

6. Träger nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die funktionellen Gruppen des homobifunktionalen Linkers folgende Gruppen sind:

- Aldehyde und Ketone
- Isocyanate, Isothiocyanate
- Carbonsäuren
- Carbonsäurederivate:

a) Carbonsäureester, insbesondere Methyl-, Ethyl- und aktivierte Ester wie

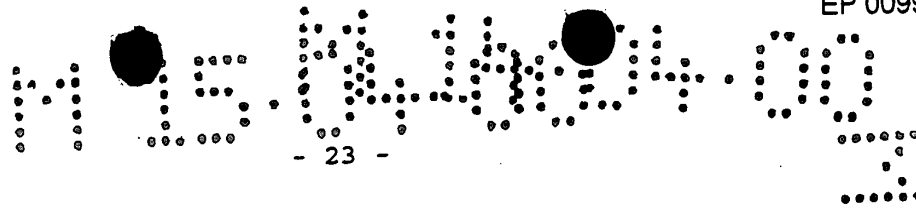
Ester des p-Nitrophenols oder des N-Hydroxysuccinimids

b) Carbonsäurechloride ($R-COCl$)

c) Carbonsäureazide ($R-CON_3$)

d) gemischte Anhydride mit Kohlensäuremonoester ($R-CO-O-COR'$).

THIS PAGE BLANK (USTPT)



7. Träger nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Oligo- oder Polynucleotid unter Ausbildung einer kovalenten Bindung mittels einer am 3'- oder 5'-Terminus über ein Alkan mit einer Länge von 6 bis 18 Methylengruppen oder über einen Polyether von 2 bis 20 sich wiederholenden Struktureinheiten synthetisch oder über die PCR Reaktion angefügte primäre Aminogruppe mit einer funktionellen Gruppe des bifunktionellen Linkers reagiert hat.
8. Verwendung eines Trägers nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, in einem Verfahren zur Identifizierung und Quantifizierung von Polynucleotiden durch eine Markierung der zu analysierenden Polynucleotide und anschließende Hybridisierungsreaktion auf dem Träger.
9. Verfahren zur Erstellung von Transkriptionsprofilen, wobei
 - homologe Bereiche von mRNA einer Zielspezies und mindestens einer Modellspezies ausgewählt werden,
 - Amplifikationsprimer ausgewählt werden, die die Amplifikation von 200 bis 600, vorzugsweise 200 bis 400 bp langen Nucleinsäuren, aus den homologen Bereichen sowohl der mRNA der Zielspezies als auch der mRNA der mindestens einen Modellspezies erlauben, wobei die Amplifikationsprimer maximal 1 Mismatch pro 6 Nucleinsäuren des Amplifikationsprimers aufweisen,
 - durch Amplifikationen unter Einsatz der Amplifikationsprimer entsprechende 200 bis 600 bp lange Nucleinsäuren für die Zielspezies oder die mindestens eine Modellspezies amplifiziert werden und die erhaltenen Nucleinsäuren auf mindestens einem Träger immobilisiert werden,
 - der mindestens eine Träger mit einer zu analysierenden DNA- oder RNA-Probe inkubiert und die Menge an gebundener DNA oder RNA quantifiziert

THIS PAGE BLANK (USPTO)

M 15. 10. 00
- 24 -

wird.

10. Verfahren zur Herstellung eines Trägers nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei

- der Spacer in einem polaren aprotischen Lösungsmittel auf die Hauptoberfläche des Trägers aufgebracht wird, woraufhin gegebenenfalls überschüssiger nicht abreagierter Spacer entfernt wird,
- der Linker in einem wasserfreien polaren aprotischen Lösungsmittel gelöst und zur Reaktion mit dem auf der Hauptoberfläche gebundenen Spacers gebracht wird,
- das am 5'- oder 3'-Terminus über eine Alkylengruppe mit einer Aminogruppe modifizierte Oligo- oder Polynucleotid in einem Puffer aufgenommen und auf dem Träger inkubiert wird zur Bindung des Oligo- oder Polynucleotids an eine freie Gruppe des bifunktionellen Linkers, gegebenenfalls gefolgt von einer Entfernung von überschüssigen freien Gruppen des bifunktionellen Linkers und
- das auf dem Träger gebundene Oligo- oder Polynucleotid denaturiert wird.

THIS PAGE BLANK (user)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

MEYERS, Hans-Wilhelm
von Kreisler, Selting, Werner
Postfach 10 22 41
D-50462 Köln
ALLEMAGNE

ArK Sg W Da Hi HPJ ME TW JH K

27. DEZ. 1999

F 40 04 00 &

Date of mailing (day/month/year)
16 December 1999 (16.12.99)

Applicant's or agent's file reference
991233woMegn

IMPORTANT NOTICE

International application No.
PCT/EP99/04014

International filing date (day/month/year)
10 June 1999 (10.06.99)

Priority date (day/month/year)
10 June 1998 (10.06.98)

Applicant

MEMOREC MEDICAL MOLECULAR RESEARCH COLOGNE STOFFEL GMBH et al

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
AU,CN,EP,IL,JP,KP,KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

AE,AL,AP,BA,BB,BG,BR,CA,CU,CZ,EA,EE,GD,GE,HR,HU,ID,IN,IS,LC,LK,LR,LT,LV,MG,MK,MN,
MX,NO,NZ,OA,PL,RO,SG,SI,SK,SL,TR,TT,UA,UZ,VN,YU,ZA

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on
16 December 1999 (16.12.99) under No. WO 99/64623

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

J. Zahra

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Telephone No. (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (user)

Continuation of Form PCT/IB/308

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF
THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

Date of mailing (day/month/year) 16 December 1999 (16.12.99)	IMPORTANT NOTICE
Applicant's or agent's file reference 991233woMegn	International application No. PCT/EP99/04014
<p>The applicant is hereby notified that, at the time of establishment of this Notice, the time limit under Rule 46.1 for making amendments under Article 19 has not yet expired and the International Bureau had received neither such amendments nor a declaration that the applicant does not wish to make amendments.</p>	

THIS PAGE BLANK (uspro)

PCT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

MEYERS, Hans-Wilhelm
Von Kreisler Selting Werner
Postfach 10 22 41
D-50462 Köln
ALLEMAGNE

AW	Sg	W	Da	Hi	HPI	ME	TW	JH	K
01. SEP. 1999									
F: 10.01.00 / 10.12.99									

Date of mailing (day/month/year) 17 August 1999 (17.08.99)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 991233woMegn	International application No. PCT/EP99/04014

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

MEMOREC MEDICAL MOLECULAR RESEARCH COLOGNE STOFFEL GMBH (for all designated
States except US)
BOSIO, Andreas et al (for US)

International filing date : 10 June 1999 (10.06.99) ✓
Priority date(s) claimed : 10 June 1998 (10.06.98) ✓
10 June 1998 (10.06.98) ✓
Date of receipt of the record copy
by the International Bureau : 28 July 1999 (28.07.99)
List of designated Offices :

AP : GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW
EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM
EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE
OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG
National : AE, AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IN, IS, JP, KP, KR, LC, LK,
LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA

*IL wurde
nachbenannt
siehe Form
359*

ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase
☒ confirmation of precautionary designations
☒ requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer: G. Bähr
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INFORMATION ON TIME LIMITS FOR ENTERING THE NATIONAL PHASE

The applicant is reminded that the "national phase" must be entered before each of the designated Offices indicated in the Notification of Receipt of Record Copy (Form PCT/IB/301) by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by the applicable national laws.

The time limit for performing these procedural acts is **20 MONTHS** from the priority date or, for those designated States which the applicant elects in a demand for international preliminary examination or in a later election, **30 MONTHS** from the priority date, provided that the election is made before the expiration of 19 months from the priority date. Some designated (or elected) Offices have fixed time limits which expire even later than 20 or 30 months from the priority date. In other Offices an extension of time or grace period, in some cases upon payment of an additional fee, is available.

In addition to these procedural acts, the applicant may also have to comply with other special requirements applicable in certain Offices. It is the applicant's responsibility to ensure that the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most designated Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

For detailed information about the procedural acts to be performed to enter the national phase before each designated Office, the applicable time limits and possible extensions of time or grace periods, and any other requirements, see the relevant Chapters of Volume II of the PCT Applicant's Guide. Information about the requirements for filing a demand for international preliminary examination is set out in Chapter IX of Volume I of the PCT Applicant's Guide.

GR and ES became bound by PCT Chapter II on 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, and may, therefore, be elected in a demand or a later election filed on or after 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, regardless of the filing date of the international application. (See second paragraph above.)

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

CONFIRMATION OF PRECAUTIONARY DESIGNATIONS

This notification lists only specific designations made under Rule 4.9(a) in the request. It is important to check that these designations are correct. Errors in designations can be corrected where precautionary designations have been made under Rule 4.9(b). The applicant is hereby reminded that any precautionary designations may be confirmed according to Rule 4.9(c) before the expiration of 15 months from the priority date. If it is not confirmed, it will automatically be regarded as withdrawn by the applicant. There will be no reminder and no invitation. Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying the designated State concerned (with an indication of the kind of protection or treatment desired) and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.

REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 16 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before that date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 16-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 16-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau or if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 16-month time limit is the filing date of the earliest application whose priority is claimed.

THIS PAGE BLANK (uspto)

PCT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING SUBMISSION OR TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

MEYERS, Hans-Wilhelm
Von Kreisler Selting Werner
Postfach 10 22 41
D-50462 Köln
ALLEMAGNE

Av	Sg	W	Da	Hi	HP	ME	TW	JF
01. SEP. 1999								

Date of mailing (day/month/year) 17 August 1999 (17.08.99)	
Applicant's or agent's file reference 991233woMegn	IMPORTANT NOTIFICATION ✓
International application No. PCT/EP99/04014	International filing date (day/month/year) 10 June 1999 (10.06.99)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 10 June 1998 (10.06.98)
Applicant MEMOREC MEDICAL MOLECULAR RESEARCH COLOGNE STOFFEL GMBH et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c)** which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c)** which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
10 June 1998 (10.06.98)	198 25 899.2 ✓	DE	28 July 1999 (28.07.99)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

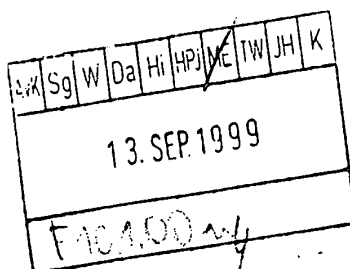
Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

G. Bähr

Telephone No. (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)



TENT COOPERATION TRE... Y

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

MEYERS, Hans-Wilhelm
Von Kreisler Selting Werner
Postfach 10 22 41
D-50462 Köln
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 24 August 1999 (24.08.99)	
Applicant's or agent's file reference 991233woMegn	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/EP99/04014	International filing date (day/month/year) 10 June 1999 (10.06.99)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 10 June 1998 (10.06.98)
Applicant MEMOREC MEDICAL MOLECULAR RESEARCH COLOGNE STOFFEL GMBH et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
10 June 1998 (10.06.98)	198 25 899.2 ✓	DE	28 July 1999 (28.07.99)
10 June 1998 (10.06.98)	98110608.1 ✓	EP	17 Augu 1999 (17.08.99)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Carlos Naranjo

THIS PAGE BLANK (uspto)

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12Q 1/68		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/64623
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 16. Dezember 1999 (16.12.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/04014		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 10. Juni 1999 (10.06.99)			
(30) Prioritätsdaten: 198 25 899.2 10. Juni 1998 (10.06.98) DE 98110608.1 10. Juni 1998 (10.06.98) EP			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MEMO-REC MEDICAL MOLECULAR RESEARCH COLOGNE STOFFEL GMBH [DE/DE]; Stöckheimer Weg 1, D-50829 Köln (DE).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): <u>BOSIO</u> , Andreas [DE/DE]; Kyffhäuser Strasse 55, D-50674 Köln (DE). <u>STOFFEL</u> , Wilhelm [DE/DE]; Kornelimünsterstrasse 14, D-50933 Köln (DE). <u>STOFFEL</u> , Markus [DE/US]; Apartment 33R, 504 East 63rd, New York, NY 10021 (US).			
(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; von Kreisler, Selt-ing, Werner, Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).			

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

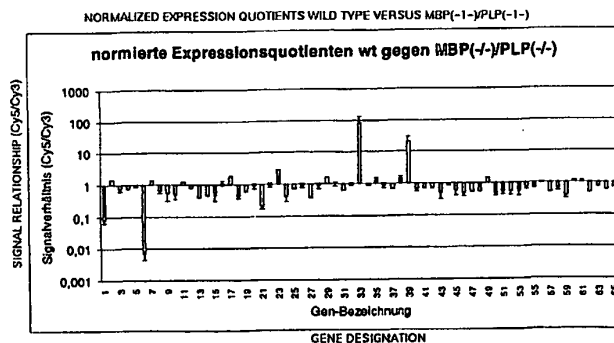
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: SUPPORT FOR THE PARALLEL IDENTIFICATION AND ESTABLISHMENT OF TRANSCRIPTION PROFILES OF POLYNUCLEIC ACIDS

(54) Bezeichnung: TRÄGER FÜR DIE PARALLELE IDENTIFIZIERUNG UND ERSTELLUNG VON TRANSKRIPTIONSPROFILIEN VON POLYNUCLEINSÄUREN

(57) Abstract

The invention relates to a support. Oligonucleotides or polynucleotides are covalently bound with the 5'- or 3'-termination on least one main surface of said support via bifunctional spacers and bifunctional linkers. The support is characterized in that the oligonucleotides or polynucleotides which are covalently bound with the 5'- or 3'-termination via bifunctional spacers and bifunctional linkers comprise 200 to 600 bp, and the oligonucleotides or polynucleotides can be obtained by using a method which comprises the following steps: Selecting homologous regions of mRNA of a target species and of at least one model species; selecting amplification primers which permit the amplification of 200 to 600, preferably 200 to 400 bp long nucleic acids from the homologous regions of both the mRNA of the target species and the mRNA of at least one model species, whereby the amplification primers optionally comprise a maximum of 1 mismatch per 6 nucleic acids of the amplification primer; immobilizing the nucleic acids on at the least one main surface of the support, said nucleic acids being obtained from the corresponding 200 to 600 bp long nucleic acids which are amplified for the target species or for the at least one model species by amplifications using the amplification primers.



(57) Zusammenfassung

Träger, an dessen mindestens einer Hauptoberfläche Oligo- oder Polynucleotiden mit dem 5'- oder 3'-Terminus über bifunktionelle Spacer und bifunktionelle Linker kovalent gebunden sind, dadurch gekennzeichnet, daß die mit dem 5'- oder 3'-Terminus über bifunktionelle Spacer und bifunktionelle Linker kovalent gebundenen Oligo- oder Polynucleotiden 200 bis 600 bp aufweisen und die Oligo- oder Polynucleotiden erhältlich sind durch ein Verfahren mit folgenden Schritten: Auswahl homologer Bereiche von mRNA einer Zielspezies und mindestens einer Modellspezies; Auswahl von Amplifikationsprimern, die die Amplifikation von 200 bis 600, vorzugsweise 200 bis 400 bp langen Nucleinsäuren, aus den homologen Bereichen sowohl der mRNA der Zielspezies als auch der mRNA der mindestens einen Modellspezies erlauben, wobei gegebenenfalls die Amplifikationsprimer maximal 1 Mismatch pro 6 Nucleinsäuren des Amplifikationsprimers aufweisen; Immobilisierung der durch Amplifikationen unter Einsatz der Amplifikationsprimer entsprechende 200 bis 600 bp lange Nucleinsäuren für die Zielspezies oder die mindestens eine Modellspezies erhaltenen Nucleinsäuren an der mindestens einen Hauptoberfläche des Trägers.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshjan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Träger für die parallele Identifizierung und
Erstellung von Transkriptionsprofilen von Polynucleinsäuren

Die Erfindung betrifft einen Träger, an dessen mindestens einer Hauptoberfläche Oligo- oder Polynucleotiden mit dem 5'- oder 3'-Terminus über bifunktionelle Spacer und bifunktionelle Linker kovalent gebunden sind, Verwendung des erfindungsgemäßen Trägers, Herstellung des erfindungsgemäßen Trägers sowie ein Verfahren zur Erstellung von Transkriptionsprofilen.

Analysen, die auf molekularbiologischer Ebene durchgeführt werden, gewinnen zunehmend an Bedeutung. In den meisten Fällen wird in solchen Methoden ein zu analysierendes Nucleinsäuregemisch durch Hybridisierungsreaktionen mit sogenannten Sonden hybridisiert und charakterisiert. Insbesondere bei Fragestellungen, bei denen gleichzeitig eine Vielzahl von Polynucleinsäuren verschiedener Art nachgewiesen werden sollen, kommt es zu methodischen Engpässen. Man versucht insbesondere durch parallele Prozeßführung eine Vielzahl von Analyseschritten in kurzer Zeit durchzuführen. Dabei stellt sich oftmals das Problem, daß Trägersysteme, auf denen die Hybridisierungsexperimente durchgeführt werden können, nur beschränkte Raumkapazität aufweisen. Man versucht daher durch Verwendung von Trägern, auf denen eine Vielzahl von Proben plziert werden können, diese Probleme zu lösen. Insbesondere werden im Stand der Technik Träger beschrieben, die Mikro- oder Nanokompartimente aufweisen zur Aufnahme entsprechend kleiner Volumina, der meistens in Lösung befindlichen Analyten. Entsprechende Trägersysteme sind beispielsweise durch Ätzen von Oberflächen von aus Silizium aufgebauten Wafern erhältlich.

E.M. Southern (E.M. Southern et al. (1992), Nucleic Acids Research 20: 1679 bis 1684 und E.M. Southern et al. (1997), Nucleic Acids Research 25: 1155 bis 1161) beschreibt die Herstellung sogenannter Oligonucleotid-Anordnungen durch direkte Synthese an einer Glasoberfläche, die mit 3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan und

anschließend mit einem Glykol derivatisiert wurde.

Ein ähnliches Verfahren betrifft die Veröffentlichung von S.P.A. Fodor (Pease, A.C. et al. (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**: 5022 bis 5026). Die dort beschriebene *in situ* Oligonucleotidsynthese findet mittels vollautomatischer, lichtgesteuerter kombinatorischer Chemie statt. Die Direktsynthese von Oligonucleotiden auf einer Glasoberfläche erlaubt eine maximale Länge von ca. 30 Basen. Eine Sicherstellung des Syntheseverlaufs der individuellen Sequenz längerer Oligonucleotide ist - wenn überhaupt - mit einem nicht vertretbaren Aufwand verbunden. Diese Oligonucleotide als Leit-DNA erlauben die Hybridisierung eines nur sehr kurzen Stücks der Analyse-Nucleinsäure. Um diesen Nachteil zu umgehen, werden für jede zu analysierende Nucleinsäure mehrere Oligonucleotide als Leit-DNAs synthetisiert. Dies hat eine größere Platzbeanspruchung und damit größeres Probenvolumen an Analyse-Nucleinsäure zur Folge. Die geringe Länge der Oligonucleotide schließt ferner Kreuzhybridisierungen mit verschiedenen Analyse-Nucleinsäuren nicht aus. Dadurch wird eine eindeutige Zuordnung der aufgenommenen Signale erschwert.

P.O. Brown (DeRisi et al. (1997), Science **278**: 680-686) offenbart zur Herstellung sogenannter DNA-Chips Polylysin beschichtete Glasoberflächen, auf die kleinste DNA-Mengen mittels Kapillartechnik aufgetropft werden. Die Immobilisierung der Leit-DNA auf einer Polylysin-Oberfläche beeinträchtigt allerdings die Hybridisierung und setzt damit die Nachweisgrenze und Verlässlichkeit bei der Detektion der Analyse-Nucleinsäuren beträchtlich herab.

L.M. Smith (Guo, Z. et al. (1994), Nucleic Acids Research **22**: 5456-5465) beschreibt eine Technik zur Immobilisierung von Oligonucleotiden, die darauf beruht, daß Oligonucleotide mit einer 5' terminalen Aminogruppen derivatisiert werden und diese dann auf eine Glasoberfläche gebracht werden, die mit 3-Aminopropyltrimethoxysilan und anschließend mit 1,4-Phenyldiisothiocyanat derivatisiert wurde. Während die Chemie zur Immobilisierung der Oligonucleotide die Nachteile der zuvor

beschriebenen Systeme umgeht, gelten auch hier die zuvor erwähnten Nachteile, die durch die Verwendung von kurzen Oligonucleotiden als Leit-DNA bedingt sind.

Solche Systeme sind üblicherweise nur recht aufwendig herstellbar und erreichen oft eine nicht zufriedenstellende Kapazität von Probenkompartimenten, die für eine entsprechende Parallelisierung notwendig wären.

Außerdem ist die Verwendung von vollständigen cDNAs nicht ratsam. Zum einen werden Kreuzreaktionen bei stark homologen Genfamilien auftreten und zum anderen enthalten die cDNA's repetitive Elemente, die zu unspezifischen Hybridisierungen führen können. Es können daher Artefakte verursacht werden. Bei speziesübergreifenden Vergleichen können die genannten Artefakte zu einer starken Limitierung der Methodik führen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist mithin die Bereitstellung eines Trägers, der die genannten Nachteile des Standes der Technik vermeidet. Insbesondere soll der erfindungsgemäße Träger Nucleinsäuren, bevorzugt mit definierter Sequenz und möglichst gleicher Länge, in hoher Dichte binden können und eine hohe Parallelisierung von zu untersuchenden Proben erlauben.

Erfindungsgemäß gelöst wird diese Aufgabe durch einen Träger mit den Merkmalen des Patentanspruchs 1. Bevorzugte Weiterbildungen des erfindungsgemäßen Trägers finden sich in den Unteransprüchen. Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ebenfalls ein Verfahren zur Herstellung des erfindungsgemäßen Trägers sowie dessen Verwendung. Die Bereitstellung des erfindungsgemäßen Trägers ermöglicht ein neues und erfinderisches Verfahren, das in vorteilhafter Weise eine Quantifizierung von Transkriptionsprofilen erlaubt.

Figur 1 betrifft ein Reaktionsschema, in dem die chemische Derivatisierung der Festphasenoberfläche und Kopplung der Leit-DNA dargestellt ist.

Figur 2 betrifft einen Vergleich der Expressionsintensitäten von 72 unterschiedlichen Genen in zwei gleichen aber unterschiedlich markierten Wildtyp-Maus-Gehirn RNA Proben, wobei Figur 2a eine mit Cy3-dCTP und Figur 2b eine mit Cy5-dCTP markierte Probe betrifft. Figur 2c zeigt Signalintensitäten wt/wt der beiden fluoreszenzmarkierten Proben in einem doppeltlogarithmischen Punktdiagramm. Figur 2d betrifft den Expressionsquotienten wt/wt, wobei das Verhältnis von Cy3 zu Cy5 markierter Probe als halblogarithmisches Balkendiagramm dargestellt ist.

Figur 3 zeigt den Vergleich der Expressionsintensitäten von 72 unterschiedlichen Genen in einer Wildtyp-Maus-Gehirn RNA Probe und einer Mutanten (PLP^{-/-}/MBP^{-/-}) Maus-Gehirn RNA Probe. Figur 3a betrifft die mit Cy3-dCTP markierten Nucleinsäuren gewonnenen Expressionsprofile und Figur 3b zeigt die mit Cy5-dCTP markierten Nucleinsäuren gewonnenen Expressionsprofile. Figur 3c zeigt die entsprechenden Signalintensitäten analog Figur 2c. Figur 3d betrifft normierte Expressionsquotienten wt analog Figur 2d.

Der erfindungsgemäße Träger mit an mindestens einer Hauptoberfläche des im wesentlichen planaren Trägers kovalent gebundener Oligo- oder Polynucleinsäuren weist an der Hauptoberfläche des Trägers eine reaktive Gruppe auf, die mit einem bifunktionellen Spacer unter Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen einer funktionellen Gruppe des Spacers und der reaktiven Gruppe der Hauptoberfläche des Trägers reagiert hat. Unter Hauptoberfläche wird jede Oberfläche verstanden, die eine hinreichende Dimension aufweist, um eine für die Verwendung des Trägers notwendige Anzahl von Proben aufzunehmen.

Die zweite funktionelle Gruppe des bifunktionellen Spacers hat mit einer funktionellen Gruppen eines bifunktionellen Linkers reagiert und die zweite funktionelle Gruppe des bifunktionellen Linkers hat mit dem Oligo- oder Polynucleotid, das kovalent gebunden werden soll (Leit-Nucleinsäure), unter Ausbil-

dung einer kovalenten Bindung am 5'- oder 3'-Terminus des Oligo- oder Polynucleotid reagiert.

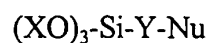
Der erfindungsgemäße Träger ist dadurch gekennzeichnet, daß die mit dem 5'- oder 3'-Terminus über bifunktionelle Spacer und bifunktionelle Linker kovalent gebundenen Oligo- oder Polynucleinsäuren eine Länge von 200 bis 600 bp aufweisen. Die Oligo- oder Polynucleinsäuren sind durch ein Verfahren mit folgenden Schritten erhältlich:

Auswahl homologer Bereiche von mRNA einer Zielspezies und mindestens einer Modellspezies,

Auswahl von Amplifikationsprimern, die die Amplifikation von 200 bis 600, vorzugsweise 200 bis 400 bp langen Nucleinsäuren, aus den homologen Bereichen sowohl der mRNA der Zielspezies als auch der mRNA der mindestens einen Modellspezies erlauben, wobei gegebenenfalls die Amplifikationsprimer maximal 1 Mismatch pro 6 Nucleinsäuren des Amplifikationsprimers aufweisen,

Immobilisierung der durch Amplifikationen unter Einsatz der Amplifikationsprimer entsprechende 200 bis 600 bp lange Nucleinsäuren für die Zielspezies oder die mindestens eine Modellspezies erhaltenen Nucleinsäuren an der mindestens einen Hauptoberfläche des Trägers.

Vorzugsweise ist das Polynucleotid eine RNA, DNA oder PNA. Der Träger besteht vorzugsweise aus einem Glas oder einem anderen hauptsächlich aus Siliziumoxid bestehenden Material. Vorzugsweise weist der bifunktionelle Spacer, der an die Hauptoberfläche des erfindungsgemäßen Trägers gebunden ist, die nachstehende Struktur auf



wobei

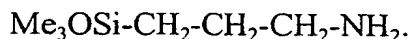
$X = C_1-C_3$ Alkyl,

$Y = C_2-C_4$ Alkylen,

Nu = eine nucleophile Gruppe wie $-NH_2$, $-NHR$, mit

$R = -CH_2-CH_2-NH_2$, $-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-NH_2$, $-CO-NH_2$, oder SH , ist.

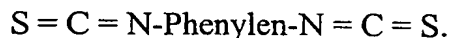
Insbesondere bevorzugt ist ein Spacer der Struktur



Vorzugsweise ist der bifunktionelle Linker ausgewählt aus der Gruppe starrer homobifunktioneller Linker bestehend aus:

2,7 substituiertem Fluoren, 2, 6 substituiertem Naphtalin, 2, 6 substituiertem Anthracen, 2, 7 substituiertem Phenanthren, 4, 4' substituiertem Biphenyl, 4, 4' substituierten Benzom ($C_6H_5-CO-CH(OH)-C_6H_5$), 4, 4' substituiertem Benzil ($C_6H_5-CO-CO-C_6H_5$), 4, 4' substituiertem Benzophenon ($C_6H_5-CO-C_6H_5$), 4, 4' substituiertem Diphenylmethan ($C_6H_5-CH_2-C_6H_5$), 4, 4' substituiertem Stilben ($C_6H_5-CH=CH-C_6H_5$), 1, 3 substituiertem Allen ($CH_2=C=CH_2$), 1,4-disubstituiertem Benzol.

Insbesondere bevorzugt ist ein Linker mit der folgenden Struktur



Die Verwendung starrer bifunktioneller Linker hat den Vorteil, daß im wesentlichen

nur eine der beiden Gruppen mit der Oberfläche des Trägers reagiert.

Als funktionelle Gruppen, mit denen der homobifunktionelle Linker substituiert ist, sind bevorzugt

- Aldehyde und Ketone, Isocyanate, Isothiocyanate, Carbonsäuren, Carbonsäurederivate:

- a) Carbonsäureester: im Allgemeinen die leicht zugänglichen methyl und ethyl-Ester. Besser geeignet sollten aber aktivierte Ester wie z.B. Ester des p-Nitrophenols oder des N-Hydroxysuccinimids sein.
- b) Carbonsäurechloride ($R-COCl$)
- c) Carbonsäureazide ($R-CON_3$)
- d) gemischte Anhydride mit Kohlensäuremonoester ($R-CO-O-COR'$).

Der erfindungsgemäße Träger weist vorzugsweise ein kovalent an den bifunktionellen Linker gebundenes Oligo- oder Polynucleotid auf, wobei die kovalente Bindung mittels einer am 3'- oder 5'-Terminus über ein Alkan mit einer Länge von 4 bis 30 Methylengruppen oder über einen Polyether mit 2 bis 20 wiederholenden Struktureinheiten synthetisch oder über die PCR Reaktion angefügte primäre Aminogruppe gebunden ist.

200 bis 400 bp lange DNA Fragmente bilden aus folgenden Gründen bevorzugte Leit-DNAs: Die Länge und die damit gegebene Schmelztemperatur sind ausreichend, um - bei sorgfältiger Auswahl und einer maximalen Komplexität wie sie das menschliche Genom darstellt - mit hoher Sicherheit eine nicht redundante Hybridisierung zu garantieren.

Die kürzesten bekannten cDNAs liegen im Bereich von ca. 200 bp. Somit können alle cDNAs einer zu analysierenden cDNA-Population vollständig oder als 200 bis 400 bp-Fragmente an die Festphase gebunden werden. Die ähnliche Länge aller

aufgetragenen DNAs ergibt bei der Hybridisierung mit einer markierten Analyse-Nucleinsäure Hybridisierungssignale, die nicht durch die Länge oder unterschiedliche Hybridisierungskinetik der Leit-Nucleinsäure beeinträchtigt werden.

Die Sequenzen der aufzutragenden Leit-DNAs werden vorzugsweise jeweils einzeln, z.B. durch eine eigens hierfür hergestellte Software, insbesondere aus den öffentlich zur Verfügung stehenden Gen-Datenbank herausgesucht. Es ist bevorzugt die Leit-DNAs auf Nicht-Redundanz zu prüfen. Damit ist weitestgehend ausgeschlossen, daß eine Leit-DNA mit mehreren Analyse-Nucleinsäuren hybridisiert und so zu falsch positiven Signalen führen kann. Die Leit-DNA wird, z.B. mittels RT-PCR und sequenzspezifischer Primer, ausgehend von Gesamt-RNA nach gängigen Protokollen, amplifiziert.

Bei der Auswahl der sequenzspezifischen Primer werden diese vorzugsweise so gewählt, daß sie zur Amplifizierung der gewünschten Leit-Nucleinsäure verschiedener Spezies wie z.B. human und murin geeignet sind. Auch bei diesem Vorgang hat sich eine Länge der Leit-Nucleinsäure von 200 bis 400 bp als geeignet erwiesen. Die Länge reicht aus um in ca. 70 bis 80% der Fälle 18 bis 22 bp lange Primer zu definieren, die mit maximal 3 "mismatch-Basen" die Amplifizierung der Leit-Nucleinsäure beider Spezies erlaubt.

Als Träger werden vorzugsweise an sich bekannte Glas-Objektträger benutzt. Im Gegensatz zu oftmals verwendeten Nylonmembranen bieten z.B. Objektträger den Vorteil, daß sie aufgrund ihrer Starrheit und der Tatsache, daß Glas für die meisten Reagenzien inert ist, wesentlich leichter zu bearbeiten und anschließend von unspezifischen Hybridisierungssignalen freizuwaschen sind. Ein großer Vorteil liegt weiterhin darin, daß Glas zur fluoreszenzgestützten Analyse genutzt werden kann.

Insbesondere die Nutzung piezoelektrischer Nanodispenser zum Auftragen der Leit-DNA auf die Festphase erlaubt eine sehr genaue Dosierung, was für eine verlässliche

Quantifizierung der Analyse-DNA bevorzugt ist, die im direkten Zusammenhang mit einer reproduzierbaren Menge an Leit-DNA steht. Die Möglichkeit, Tropfenvolumina von 0,1 nl aufzutragen, erlaubt die Anordnung von 100.000 unterschiedlichen Leit-DNAs z.B. auf der Fläche eines Objektträgers (76 x 26 mm). Damit wird es möglich, auch sehr geringe Nucleinsäuremengen zu detektieren.

Die erfindungsgemäße Immobilisierung der Leit-DNA über die Reaktion eines Isothiocyanats mit einem primären Amin zu N-substituierten Thioharnstoffen birgt Vorteile. Sowohl die Chemikalien als auch die aminomodifizierten 5'-Oligonucleotidprimer zur Synthese der DNAs sind kostengünstig im Vergleich zu anderen Syntheseverfahren, die auf der Phosphoramidit-Chemie beruhen. N-substituierte Thioharnstoffe stellen eine stabile Verbindung dar. Die nach dem hier beschriebenen Verfahren kovalent gebundene DNAs werden auch durch mehrstündiges Kochen in Wasser nicht von der Festphase abgetrennt. Damit können die DNA-Chips auch einer Mehrfachverwendung zugänglich sein. Dies scheitert bei anderen Chips unter anderem daran, daß die für die Regenerierung erforderlichen Waschbedingungen zum Entfernen von spezifischen und unspezifischen Analyse-DNAs aufgrund der Instabilität der Festphasen-Bindung nicht stringent genug gewählt werden können.

Durch die spezifische Bindung der DNA über ihr 5' oder 3' Ende ist weitestgehend sichergestellt, daß nahezu die gesamte Leit-DNA für die Hybridisierung mit der Analyse-DNA zur Verfügung steht und nicht durch unspezifische Bindung an der Oberfläche beeinträchtigt ist. Die DNA-Doppelhelix wird sich aufgrund ihrer recht starren Struktur und negativen Ladung senkrecht zur Festphase ausrichten und so eine maximale Dichte an aufzutragender Leit-DNA ermöglichen.

Die spezifische und monovalente Bindung der Leit-DNA an die Festphase erlaubt nicht zuletzt eine Kontrolle der Menge an aufgetragener DNA über die zur Verfügung stehenden derivatisierbaren Isothiocyanatgruppen.

Die erfindungsgemäße Verwendung eines erfindungsgemäßen Trägers in einem Verfahren zur Identifizierung und Quantifizierung von Polynucleotiden durch eine Markierung der zu analysierenden polynucleotide und anschließende Hybridisierung auf dem Träger ist ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Erstellung von Transkriptionsprofilen weist die folgenden Schritte auf:

homologe Bereiche von mRNA einer Zielspezies und mindestens einer Modellspezies werden ausgewählt,

Amplifikationsprimer, die die Amplifikation von 200 bis 600, vorzugsweise 200 bis 400 bp langen Nucleinsäuren, aus den homologen Bereichen sowohl der mRNA der Zielspezies als auch der mRNA der mindestens einen Modellspezies erlauben werden ausgewählt, wobei die Amplifikationsprimer maximal 1 Mismatch pro 6 Nucleinsäuren des Amplifikationsprimers aufweisen,

durch Amplifikationen werden unter Einsatz der Amplifikationsprimer entsprechende 200 bis 600 bp lange Nucleinsäuren für die Zielspezies oder die mindestens eine Modellspezies amplifiziert und die erhaltenen Nucleinsäuren auf mindestens einem Träger immobilisiert,

der mindestens eine Träger wird mit einer zu analysierenden DNA- oder RNA-Probe inkubiert und die Menge an gebundener DNA oder RNA quantifiziert.

Damit die Erstellung eines Transkriptionsprofils also eine qualitative und quantitative Analyse der Genexpression möglich ist, wird die zu analysierende Nucleinsäure, z.B. RNA oder DNA, markiert. Der Hybridisierungsprozess führt dann dazu, daß die auf der Oberfläche immobilisierten cDNAs mit den entsprechenden markierten

DNAs oder RNAs der zu analysierenden Probe zusammengeführt werden. Dies führt zur Markierung der cDNAs auf der Oberfläche des Trägers mit dem entsprechenden Gegenstück, das in der zu analysierenden Probe vorhanden gewesen ist.

Die Markierung der zu analysierenden Probe kann auf unterschiedliche Weise erfolgen.

Es können z.B.

1. Agentien genutzt werden, die direkt mit der RNA oder DNA reagieren,
2. auf enzymatischem Wege modifizierte Nucleotide angefügt werden,
3. über eine RT-Reaktion unter Einbau modifizierter Nucleotide die RNA in markierte cDNA umgeschrieben werden.

Die Agentien bzw. modifizierten Nucleotide können Elemente enthalten, die z.B. radioaktiv sind oder zur Fluoreszenz oder Lumineszenz angeregt werden können, so daß mit einem geeigneten Detektionsgerät eine direkte Messung möglich ist. Sie können aber auch als Linker bzw. Hapten dienen, um eine anschließende Kopplung mit einem zweiten markierten Molekül zu ermöglichen.

Durch Einsatz unterschiedlicher Fluoreszenzesignale können auch unterschiedliche zu analysierende Proben gleichzeitig auf einem Träger zur Hybridisierung aufgegeben werden, so daß ein direkter Vergleich dieser unterschiedlichen Proben auf einem Träger möglich ist. So können z.B. zwei unterschiedliche Proben wie folgt behandelt werden. Man markiert die Nucleinsäuren, die in der einen Probe vorhanden sind mit einer ersten fluoreszierenden Verbindung und die in der zweiten separaten Probe vorhandenen Nucleinsäure mit einer zweiten fluoreszierenden Verbindung, deren emittierte Fluoreszenz von der der ersten fluoreszierenden Verbindung verschieden ist.

Die Hybridisierungslösung enthält neben den markierten Proben noch Salze, Detergentien und nicht markierte DNA wodurch optimale, auf den jeweiligen Träger abgestimmte Hybridisierungsbedingungen erreicht werden können. Vor der eigentlichen Hybridisierung kann es sinnvoll sein, eine sogenannte Vorhybridisierung durchzuführen. Dabei wird der entsprechende Träger mit der Hybridisierungslösung, allerdings ohne markierte Probe, inkubiert und Reaktionsbedingungen werden optimierbar.

Nach der Hybridisierungsreaktion werden nicht spezifisch gebundene Probenbestandteile durch vorzugsweise mehrere Waschvorgänge abgetrennt. Die hierbei verwendeten Waschlösungen enthalten insbesondere Detergenzien wie Natriumdocylsulfat und geringe Salzmengen. Der oder die Waschvorgänge werden in der Regel in einem Temperaturbereich von 20 bis 60°C und über einen Zeitraum von 5 bis 20 Minuten durchgeführt.

Zur Erstellung eines Transkriptionsprofils werden die mittels eines geeigneten Detektionsgeräts aufgenommenen Signale quantifiziert. Die Signalintensität entspricht hierbei z.B. direkt der Anzahl der in der Hybridisierungslösung vorhandenen markierten Moleküle und damit der Expressionsstärke des entsprechenden Gens in der untersuchten Probe. Durch Normierung dieser Werte auf einen internen oder externen Standard können Transkriptionsprofile unterschiedlicher Proben miteinander verglichen werden.

Die Detektion der Hybridisierung von Leit- und Analyse-Nucleinsäuren kann nach verschiedenen Methoden erfolgen. Eine geeignete Methode besteht in der Markierung der Analyse-Nucleinsäure mittels fluoreszierender Nucleotide und anschließender Detektion der Hybridisierung mittels Fluoreszenzmikroskopie. Zur differentiellen bzw. relativen Quantifizierung von Analyse-Nucleinsäuren wird zu der fluoreszenzmarkierten Analyse-Nucleinsäure eine bekannte Menge an Referenz-

Nucleinsäure, die einen zweiten Fluoreszenzmarker trägt, zugegeben und für die Hybridisierung auf die immobilisierte Leit-DNA aufgetragen. Durch Vergleich der detektierten Signalintensitäten erfolgt eine relative Quantifizierung der Analyse-Nucleinsäure.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Trägers weist folgende Schritte auf.

Der bifunktionelle Spacer wird in einem polaren aprotischen Lösungsmittel auf die Hauptoberfläche des Trägers aufgebracht, woraufhin gegebenenfalls überschüssiger nicht abreagierter Spacer entfernt wird. Der bifunktionelle Spacer wird beispielsweise in 95%-igem Aceton/Wasser-Gemisch (Vol-%) auf die Hauptoberfläche des Trägers aufgebracht. Vorzugsweise wird der Träger nach den eventuell durchgeführten Waschschritten, insbesondere durch Erhitzen, getrocknet.

Der bifunktionelle Linker wird in einem im wesentlichen wasserfreien polaren aprotischen Lösungsmittel gelöst und zur Reaktion mit dem auf der Hauptoberfläche gebundenen Spacer gebracht. Der Linker sollte vorzugsweise in geringer Konzentration, beispielsweise im Bereich von 0,5 Gew.-% in dem polaren aprotischen Lösungsmittel vorliegen. In diesem Falle kommt z.B. ein Lösungsmittelsystem mit 10% Pyridin/Dimethylformamid (Vol-%) in Betracht. Die Reaktionszeit hängt von der Reaktionsfreudigkeit des bifunktionellen Spacers oder bifunktionellen Linkers ab und kann durchaus mehrere Stunden bei Raumtemperatur oder erhöhter Temperatur betragen. Der Träger kann in diesem Zustand gekühlt und trocken mehrere Monate aufbewahrt werden.

In einem weiteren Ansatz wird das am 5'- oder 3'-Terminus über eine Alkylengruppe mit einer Aminogruppe modifizierte Oligo- oder Polynucleotid in einem Puffer aufgenommen. Hierzu bietet sich insbesondere ein basischer Puffer, beispielsweise ein Carbonatpuffer an. Die Mischung wird auf dem vorher vorbereiteten Träger inkubiert

zur Bindung des Oligo- oder Polynucleotids an eine freie Gruppe des bifunktionellen Linkers. Dies kann insbesondere für einen Zeitraum von mehreren Stunden in einer dampfgesättigten Atmosphäre erfolgen. Danach werden eventuell nicht abreagierte Gruppen des bifunktionellen Linkers entfernt. Hierzu dienen insbesondere Amine wie Ethanolamin oder Hydroxylamin. Es handelt sich dabei um dem Fachmann an sich bekannte typische Blockierungsreaktionen reaktiver Gruppen.

Danach wird das auf dem Träger gebundene Oligo- oder Polynucleotid denaturiert. Zur Denaturierung wird beispielsweise der Träger mit dem dann daran kovalent gebundenen Polynucleotid in bidestilliertem Wasser gekocht. Zur Aufrechterhaltung des denaturierten Zustandes kann der Träger mit reinem Alkohol gespült und anschließend kühl und trocken aufbewahrt werden.

Die Erfindung wird anhand der folgenden weiteren Erläuterungen näher beschrieben.

Figur 1: Chemische Derivatisierung der Festphasenoberfläche und kovalente Kopplung der Leit-DNA.

Reinigung der Glas-Objektträger: 76 x 26 mm, reinweißes Glas, ohne Beschichtung, Mattrand oder Beschriftungsfeld; z.B. Fisher Scientific unter der Bezeichnung "Objektträger Reinweiß mit geschnittenen Kanten": zwei Stunden Schütteln der Objektträger in einer Lösung aus 2 N NaOH in 70% EtOH, dreimaliges Waschen mit vollentsalztem (und bidestilliertem) Wasser und einmaliges Waschen mit Aceton.

Beschichtung: Die Objektträger werden zwei Minuten in einer Lösung aus 1% 3-Aminopropyltrimethoxysilan (APTMS) in 95% Aceton/Wasser eingetaucht, dann zehnmal jeweils fünf Minuten in Aceton gewaschen und anschließend 45 Minuten bei 110°C getrocknet.

Derivatisierung der beschichteten Objektträger mit einem Linker: Die Objektträger werden zwei Stunden in einer Lösung aus 0,2 Gew.-% 1,4 Phenyl-diIsothiocyanat (PDC) / 10 Vol.-% Pyridin/ Dimethylformamid eingetaucht und anschließend mit Methanol und Aceton gewaschen.

Aufragen der Leit-DNA zur kovalenten Kopplung: 0,1 nl PCR-Fragmente werden mittels eines Nano-Dispensers auf definierte Positionen der Objektträger aufgetragen, die Objektträger mindestens eine Stunde bei 37°C in feuchter Atmosphäre inkubiert, dann einmal mit 1% NH₄OH und dreimal mit Wasser gespült und gekühlt und trocken gelagert.

Zur Abtrennung des DNA-Gegenstranges vom Matrizen-Strang werden die Objektträger zehn Minuten bei 96°C in vollentsalztem Wasser inkubiert, mit 96% Ethanol gespült und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Die Objektträger sind nun für die Hybridisierung mit der Analyse-Nucleinsäure bereit.

Erfindungsgemäß kann auch wie folgt verfahren werden.

Es kann auch eine Glasoberfläche genutzt werden, die nicht zur Nutzung als Objektträger angefertigt wurde.

Die Dichte der derivatisierbaren Aminogruppen auf der Glasoberfläche kann durch die Konzentration der APTMS-Lösung zwischen 0,1 und 10% variiert werden, wodurch eine unterschiedliche Dichte an gekoppelter Leit-DNA eingestellt werden kann.

Die Dichte der derivatisierbaren Aminogruppen kann ferner gesteuert werden durch ein Gemisch aus APTMS/Propyltrimethoxysilan (PTMS) oder APTMS/Tetramethoxysilan (TeMS) im Verhältnis 1:10 bis 10:1.

Vor der Derivatisierung der Aminogruppen mit PDC können die gebundenen APTMS-Moleküle vernetzt werden: 30 Minuten bei 90°C mit 5% APTMS oder PTMS oder TeMS in Wasser; pH 5,5 bis 5,8.

Die Konzentration der PDC kann, wie oben für das APTMS beschrieben, zwischen 0,04% und 1% variiert werden, um so die Dichte der Linker für die Aufnahme der Leit-DNA je nach Bedarf einzustellen.

Anstelle von PDC können auch andere mit Diisothiocyanate substituierte Moleküle verwendet werden. PDC und andere starre homobifunktionelle Linker haben den Vorteil, daß eine Vernetzung von benachbarten Aminogruppen sterisch gehindert wird. Um einen größeren Abstand zwischen Trägeroberfläche und DNA zu erhalten, kann es von Vorteil sein, längere Verbindungsmoleküle zwischen derivatisierter Oberfläche und DNA oder mehrere Einheiten kurzer Verbindungsmoleküle hintereinander zu setzen.

Die Generierung der PCR-Fragmente erfolgt vorzugsweise, indem die Information einer mRNA mit Hilfe der reversen Transkriptasen in DNA umgeschrieben wird. Diese DNA wird mit der Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Für beide enzymatische Vorgänge werden unter anderem Oligonucleotidprimer benötigt, die mit einer Matrize hybridisieren und als Synthesestart für die jeweilige Polymerase dienen.

Es wird eine Liste von Genen erstellt, deren parallele Identifizierung und Quantifizierung von Interesse ist. Diese Liste wird als Input für ein hierfür erstelltes Programm genutzt. Mit Hilfe des Programms werden die Sequenzen der zu analysierenden Gene z.B. einer öffentlich zugänglichen Gen-Datenbank entnommen und Oligonucleotidpaare entworfen, die eine spezifische Amplifizierung von jeweils 200 bis 400 bp Fragmenten eines jeden Gens ergeben. Die Oligonucleotide werden synthetisiert und die RT-PCR nach einem dem Fachmann an sich bekannten Protokoll

durchgeführt. Die PCR-Fragmente werden zur Abtrennung nicht eingebauter Nucleotide und Oligonucleotide mit Ethanol gefällt und mit 100 mM Natriumcarbonat/Natriumhydrogencarbonat-Lösung, pH 9, eine Konzentration von 10 bis 1.000 ng/µl, vorzugsweise 50 bis 500 ng/µl eingestellt.

In den folgenden zwei Beispielen zur Erstellung eines Transkriptionsprofils wurden Träger nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt. Es wurden 72 unterschiedliche murine cDNAs unter Verwendung der entsprechenden spezifischen Primer (Oligonukleotide) mittels RT-PCR aus muriner Gehirn Gesamt-RNA generiert, auf die derivatisierte Glasoberfläche aufgetragen und kovalent gebunden. Jede cDNA wurde in vier Quadranten jeweils zweimal aufgetragen, also insgesamt achtmal. Es wurden jeweils 2 nl der entsprechenden cDNA mit einer Konzentration von 100 ng/µl mittels eines Dispensier-Automaten aufgetragen. Der Durchmesser der eingetrockneten Proben beträgt jeweils 350 µm, der Abstand von einem Zentrum zum nächsten zweier benachbarter Proben beträgt 750µm.

In den Beispielen wird ein Expressionsprofil von Wildtyp und Mutanten Maus Gehirn-Proben erstellt. Hierzu wurde das Gehirn von 18 Tage alten Wildtyp und mutierten Mäusen (MBP^{-/-}/PLP^{-/-}) präpariert und die Gesamt-RNA extrahiert. Zur Markierung der jeweiligen Proben wurde aus jeweils 100 µg gesamt-RNA die mRNA isoliert und mittels einer Reversen Transkriptase in die entsprechende cDNA umgeschrieben. Hierbei wurden fluoreszenzmarkierte Nukleotide (Cy3-dCTP oder Cy5-dCTP) eingebaut. Die markierten Proben wurden aufgereinigt, auf die für die Hybridisierung optimalen Bedingungen eingestellt und auf ein Volumen von 20 µl konzentriert.

Vor der eigentlichen Hybridisierungsreaktion wurde eine Vorhybridisierung des Trägers vorgenommen. Hierzu wurden 20 µl einer Salz/Detergentien/unmarkierte DNA-Lösung auf den Träger aufgegeben und mit einem Deckgläschen versehen. Nach zweistündiger Inkubation bei 62°C in einer feuchten, nach außen dichten

Kammer wurde die Reaktionslösung auf 20°C abgekühlt, das Deckgläschen abgenommen und 20 µl der eigentlichen Hybridisierungslösung aufgetropft. Wiederum wurde die Lösung mit einem Deckgläschen versehen und 12 Stunden bei 62°C in der genannten Kammer inkubiert. Anschließend wurden unspezifisch gebundene Proben mit zwei unterschiedlichen Waschlösungen vom Träger abgewaschen. Die Detektion der Signale erfolgte mit dem Laser Scanning Gerät "ScanArray 3000" der Firma General Scanning, Watertown, MA, USA. Zur Auswertung der Signale wurde eine kommerziell erhältliche Software ("ImaGene" der Firma BioDiscovery, Inc. Los Angeles, CA, USA) verwendet.

Beispiel 1

mRNA wurde zweimal aus der gleichen Gesamt-RNA isoliert und mit Cy3-dCTP bzw. Cy5-dCTP markiert. Beide Proben wurden wie beschrieben auf einem Träger zur Hybridisierung aufgegeben. Figur 2 zeigt die aufgenommenen Bilder einmal für die Cy3 markierte Probe (a) und einmal für die Cy5 markierte Probe (b).

Die über die ImaGene Software erhaltenen Signalintensitätswerte der beiden fluoreszenzmarkierten Proben sind in Figur 2c in einem doppelt logarithmischen Punktdiagramm dargestellt. Jeder Punkt im Diagramm repräsentiert eine auf dem Träger aufgetragene cDNA. Da jede der 72 cDNAs achtmal aufgetragen wurde erhält man für jede cDNA acht Punkte. Auf der x- und y-Achse läßt sich die Signalintensität der Cy3 bzw. Cy5 markierten Probe für die jeweilige cDNA ablesen. Die durchgezogene Linie umrahmt alle Punkte dessen Cy3 und Cy5 Signalintensität um nicht mehr als Faktor 2 differiert. Die gestrichelte Linie bildet die Grenze für eine dreifach differentielle Signalintensität. Da die beiden markierten Proben aus der selben Gesamt-RNA stammen, liegen alle Punkte innerhalb der durchgezogenen Linie. Die absolute Intensität der einzelnen Punkte und damit letztlich die Expressionsstärke der entsprechenden Gene erstreckt sich über drei Zehnerpotenzen. In Figur 2d ist das Verhältnis von Cy3 zu Cy5 markierter Probe als halb logarithmisches Balken-

diagramm dargestellt. Hierbei wurden jeweils die Mittelwerte aus den achtfach aufgetragenen cDNAs zugrunde gelegt.

Beispiel 2

Vergleich des Expressionsmusters einer Wildtyp Probe mit der einer Mutanten Probe.

Hierbei wurde die Wildtyp Probe mit Cy3 und die Mutanten Probe mit Cy5 markiert. Figur 3 a und b zeigen wiederum die aufgenommenen Bilder. In Figur 3c ist zu erkennen, daß eine Vielzahl von Punkten außerhalb des von den gestrichelten Linien umrandeten Bereiches liegen. Die entsprechenden Gene werden somit um mehr als das dreifache unterschiedlich stark exprimiert. In Figur 3d sind für jede cDNA der Signalquotient der Mittelwerte aufgetragen. Die Gene 1, 6, 33 und 39 zeigen die stärksten Expressionsunterschiede. So ist z.B. Gen Nr. 6 in der Wildtyp Probe ca. 100fach stärker exprimiert während z.B. Gen Nr. 33 in der Mutanten Probe ca. 100fach stärker exprimiert wird. Die Summe der bei dieser Analyse detektierbaren cDNAs und die dazugehörigen Expressionsintensitäten können als Transkriptionsprofil für die jeweiligen Probe definiert werden. Die bei dieser Analyse nachgewiesene differentielle Expression einiger Gene kann als erster Hinweis für einen ursächlichen Wechselwirkung dieser Gene mit den in der Mutanten Probe mutierten Gene aufgefasst werden.

Patentansprüche

1. Träger, an dessen mindestens einer Hauptoberfläche Oligo- oder Polynucleotiden mit dem 5'- oder 3'-Terminus über bifunktionelle Spacer und bifunktionelle Linker kovalent gebunden sind, dadurch gekennzeichnet, daß

die mit dem 5'- oder 3'-Terminus über bifunktionelle Spacer und bifunktionelle Linker kovalent gebundenen Oligo- oder Polynucleotiden 200 bis 600 bp aufweisen und die Oligo- oder Polynucleotiden erhältlich sind durch ein Verfahren mit folgenden Schritten:

Auswahl homologer Bereiche von mRNA einer Zielspezies und mindestens einer Modellspezies,

Auswahl von Amplifikationsprimern, die die Amplifikation von 200 bis 600, vorzugsweise 200 bis 400 bp langen Nucleinsäuren, aus den homologen Bereichen sowohl der mRNA der Zielspezies als auch der mRNA der mindestens einen Modellspezies erlauben, wobei gegebenenfalls die Amplifikationsprimer maximal 1 Mismatch pro 6 Nucleinsäuren des Amplifikationsprimers aufweisen,

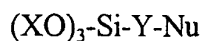
Immobilisierung der durch Amplifikationen unter Einsatz der Amplifikationsprimer entsprechende 200 bis 600 bp lange Nucleinsäuren für die Zielspezies oder die mindestens eine Modellspezies erhaltenen Nucleinsäuren an der mindestens einer Hauptoberfläche des Trägers.

2. Träger nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der bifunktionelle Linker ausgewählt ist aus der Gruppe starrer homobifunktionaler Linker bestehend aus

1,4-disubstituiertem Benzol, 2,7-substituiertem Fluoren, 2,6-substituiertem Naphtalin, 2,6-substituiertem Anthracen, 2,7-substituiertem Phenanthren, 4,4'-

substituiertem Biphenyl, 4,4'-substituierten Benzom ($C_6H_5-CO-CH(OH)-C_6H_5$), 4,4'-substituiertem Benzil ($C_6H_5-CO-CO-C_6H_5$), 4,4'-substituiertem Benzophenon ($C_6H_5-CO-C_6H_5$), 4,4'-substituiertem Diphenylmethan ($C_6H_5-CH_2-C_6H_5$), 4,4'-substituiertem Stilben ($C_6H_5-CH=CH-C_6H_5$), 1,3-substituiertem Allen ($CH_2=C=CH_2$).

3. Träger nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Oligo- oder Polynucleotid RNA, DNA oder PNA ist.
4. Träger nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger aus Glas oder einem anderen hauptsächlich aus Siliziumoxid bestehenden Materials aufgebaut ist.
5. Träger nach Anspruch 1 bis 3, wobei der bifunktionelle Spacer die nachstehende Struktur hat



wobei

X = C₁-C₃ Alkyl,

Y = C₂-C₄ Alkylen,

Nu = eine nucleophile Gruppe wie -NH₂, -NHR, mit

R = -CH₂-CH₂-NH₂, -CH₂-CH₂-NH-CH₂-CH₂-NH₂, -CO-NH₂, oder SH, ist.

6. Träger nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der Spacer Me₃OSi-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂ ist.

7. Träger nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die funktionellen Gruppen des homobifunktionalen Linkers mit folgende Gruppen sind:
- Aldehyde und Ketone
 - Isocyanate, Isothiocyanate
 - Carbonsäuren
 - Carbonsäurederivate:
 - a) Carbonsäureester: im Allgemeinen die leicht zugänglichen methyl und ethyl-Ester. Besser geeignet sollten aber aktivierte Ester wie z.B. Ester des p-Nitrophenols oder des N-Hydroxysuccinimids sein.
 - b) Carbonsäurechloride ($R-COCl$)
 - c) Carbonsäureazide ($R-CON_3$)
 - d) gemischte Anhydride mit Kohlensäuremonoester ($R-CO-O-COR'$).
8. Träger nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Oligo- oder Polynucleotid unter Ausbildung einer kovalenten Bindung mittels einer am 3'- oder 5'-Terminus über ein Alkan mit einer Länge von 6 bis 18 Methylengruppen oder über einen Polyether von 2 bis 20 sich wiederholenden Struktureinheiten synthetisch oder über die PCR Reaktion angefügte primäre Aminogruppe mit einer funktionellen Gruppe des bifunktionalen Linkers reagiert hat.
9. Verwendung eines Trägers nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, in einem Verfahren zur Identifizierung und Quantifizierung von Polynucleotiden durch eine Markierung der zu analysierenden Polynucleotide und anschließende Hybridisierungsreaktion auf dem Träger.
10. Verfahren zur Erstellung von Transkriptionsprofilen, wobei

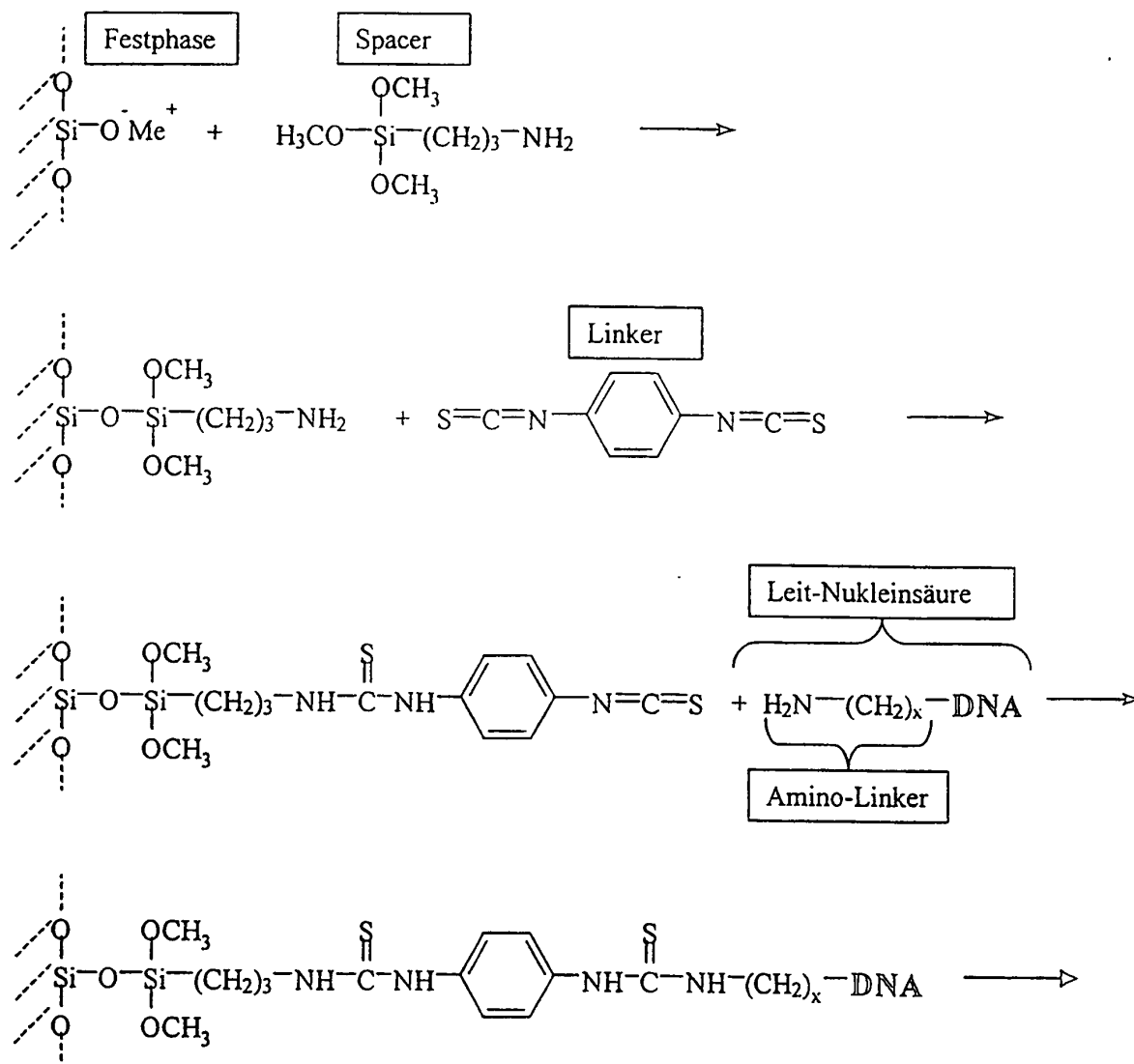
- homologe Bereiche von mRNA einer Zielspezies und mindestens einer Modellspezies ausgewählt werden,
- Amplifikationsprimer ausgewählt werden, die die Amplifikation von 200 bis 600, vorzugsweise 200 bis 400 bp langen Nucleinsäuren, aus den homologen Bereichen sowohl der mRNA der Zielspezies als auch der mRNA der mindestens einen Modellspezies erlauben, wobei die Amplifikationsprimer maximal 1 Mismatch pro 6 Nucleinsäuren des Amplifikationsprimers aufweisen,
- durch Amplifikationen unter Einsatz der Amplifikationsprimer entsprechende 200 bis 600 bp lange Nucleinsäuren für die Zielspezies oder die mindestens eine Modellspezies amplifiziert werden und die erhaltenen Nucleinsäuren auf mindestens einem Träger immobilisiert werden,
- der mindestens eine Träger mit einer zu analysierenden DNA- oder RNA-Probe inkubiert und die Menge an gebundener DNA oder RNA quantifiziert wird.

11. Verfahren zur Herstellung eines Trägers nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei

- der Spacer in einem polaren aprotischen Lösungsmittel auf die Hautoberfläche des Trägers aufgebracht wird, woraufhin gegebenenfalls überschüssiger nicht abreagierter Spacer entfernt wird,
- der Linker in einem wasserfreien polaren aprotischen Lösungsmittel gelöst und zur Reaktion mit dem auf der Hautoberfläche gebundenen Spacers gebracht wird,
- das am 5'- oder 3'-Terminus über eine Alkylengruppe mit einer Aminogruppe modifizierte Oligo- oder Polynucleotid in einem Puffer aufgenommen und auf dem Träger inkubiert wird zur Bindung des Oligo- oder Po-

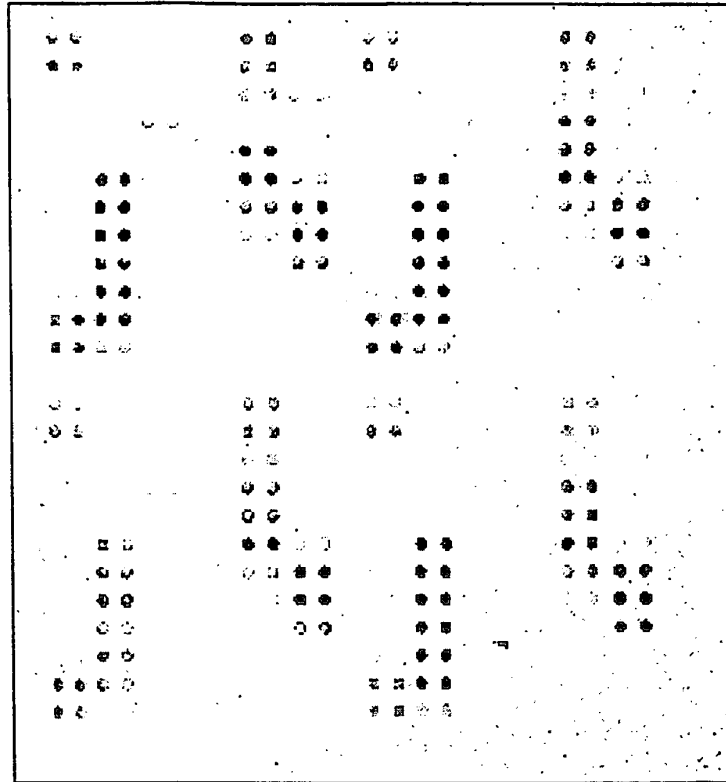
lynucleotids an eine freie Gruppe des bifunktionellen Linkers, gegebenenfalls gefolgt von einer Entfernung von überschüssigen freien Gruppen des bifunktionellen Linkers und

- das auf dem Träger gebundene Oligo- oder Polynucleotid denaturiert wird.

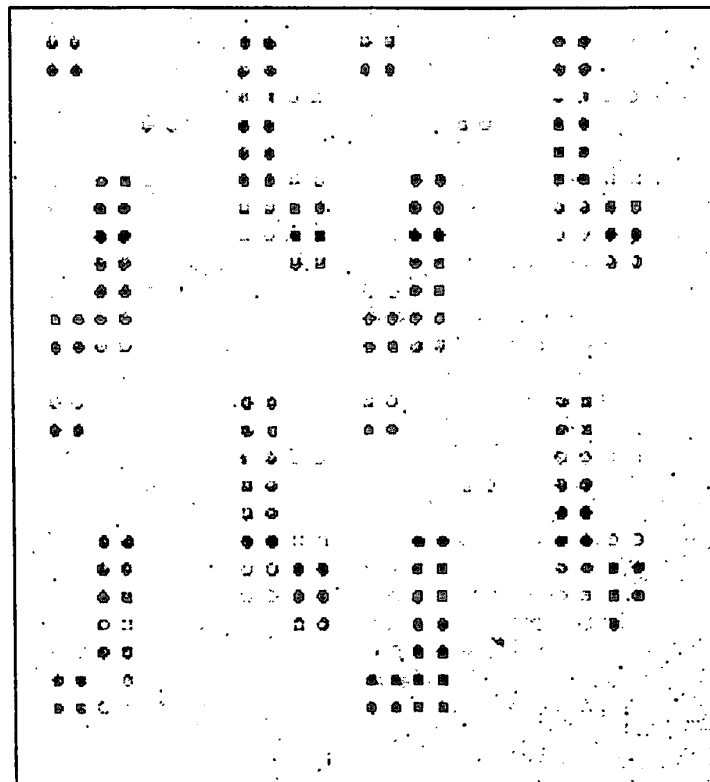


Figur 1

END PAGE BLANK (user)

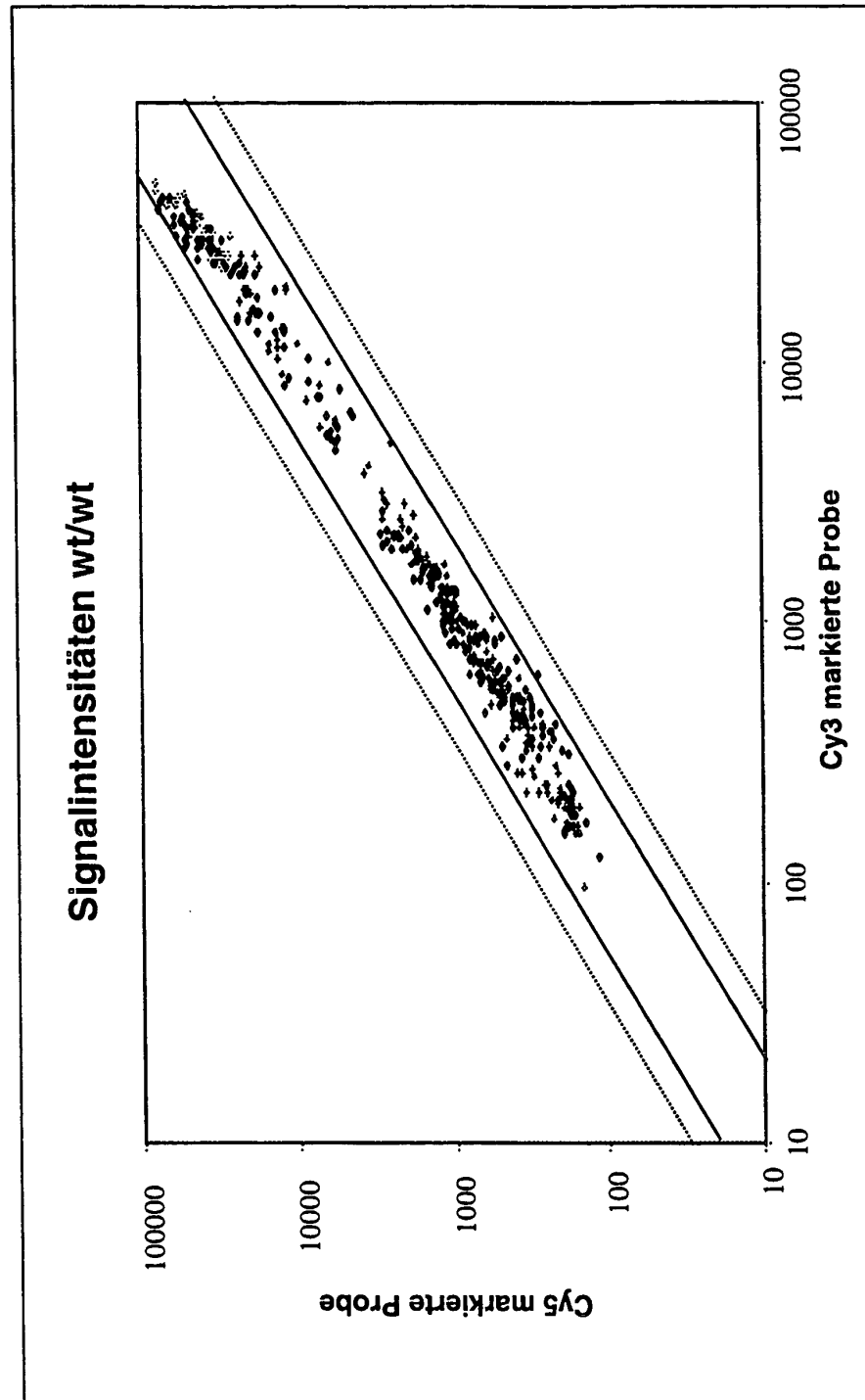


Figur 2b



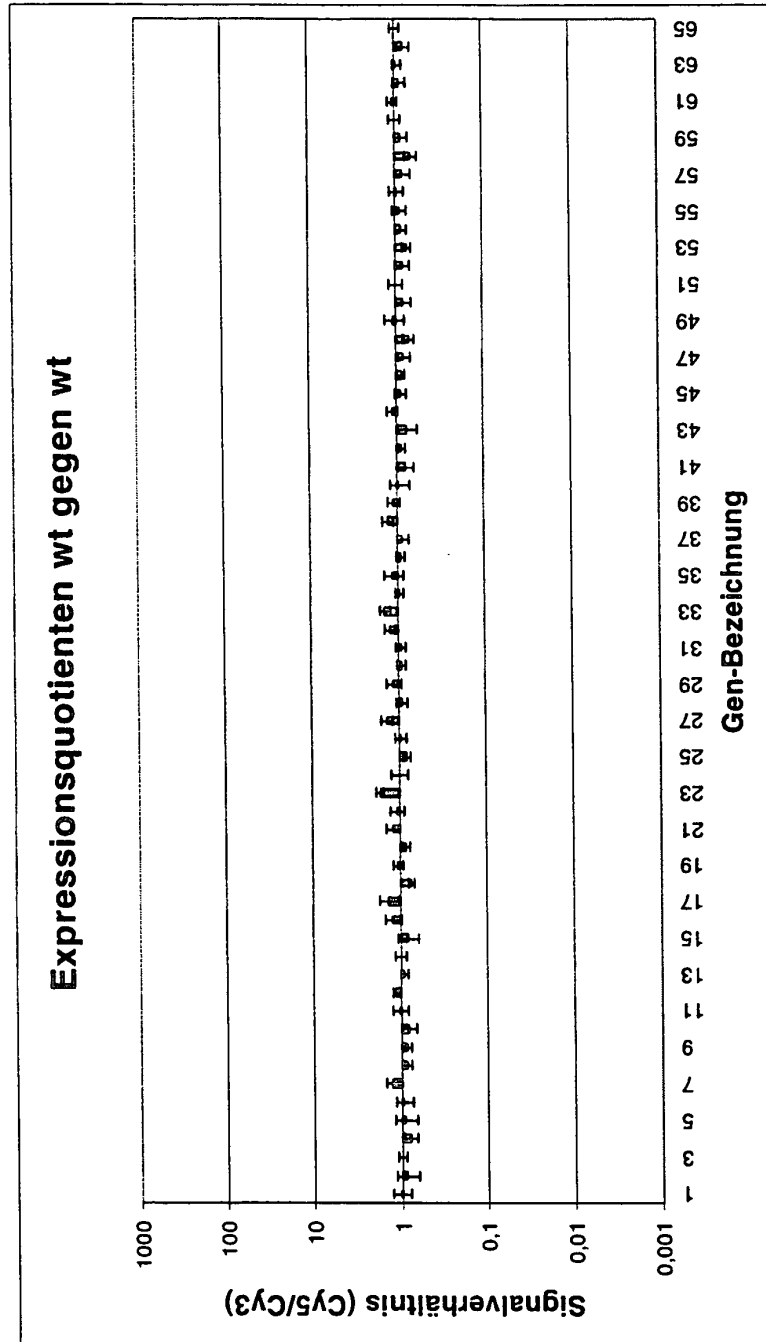
Figur 2a

THIS PAGE BLANK (USPTO)



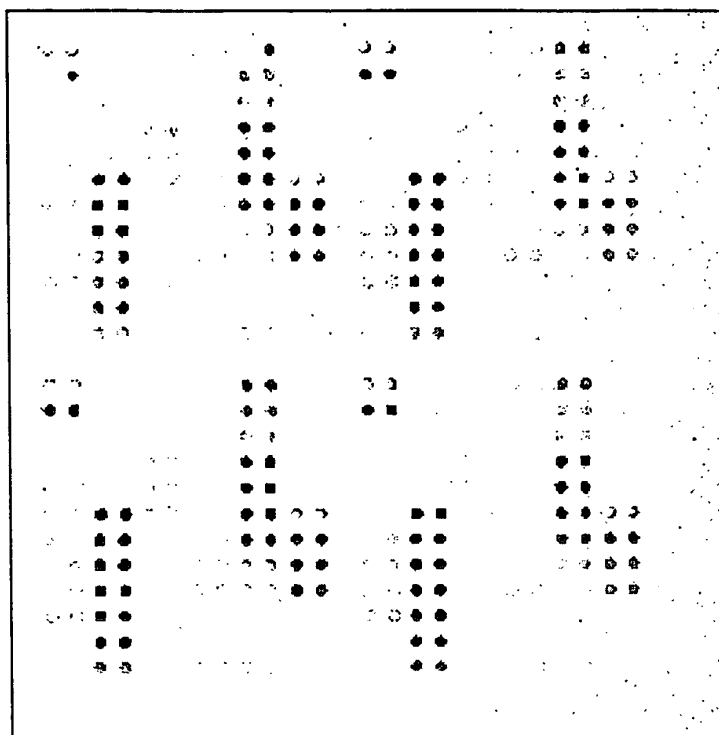
Figur 2c

THIS PAGE BLANK (USPTO)

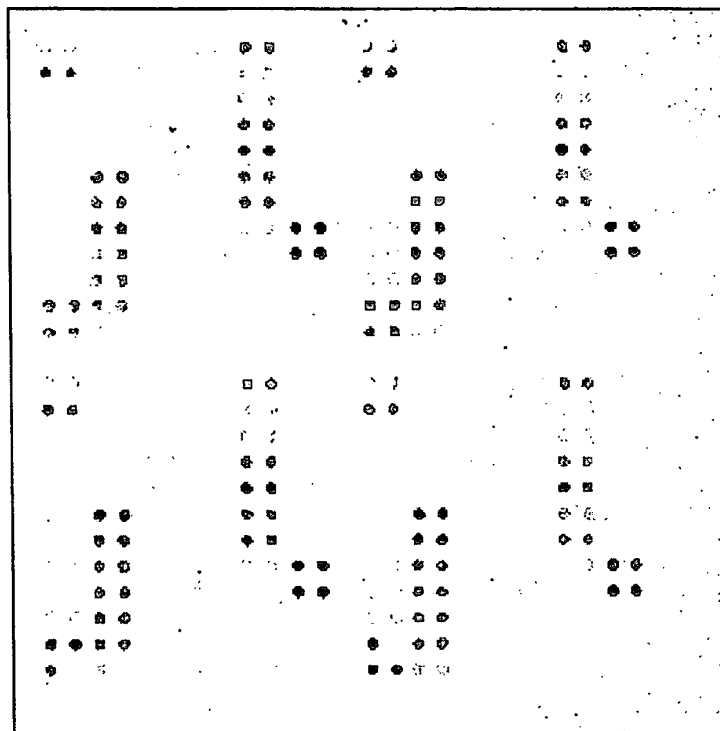


Figur 2d

... PAGE BLANK ...

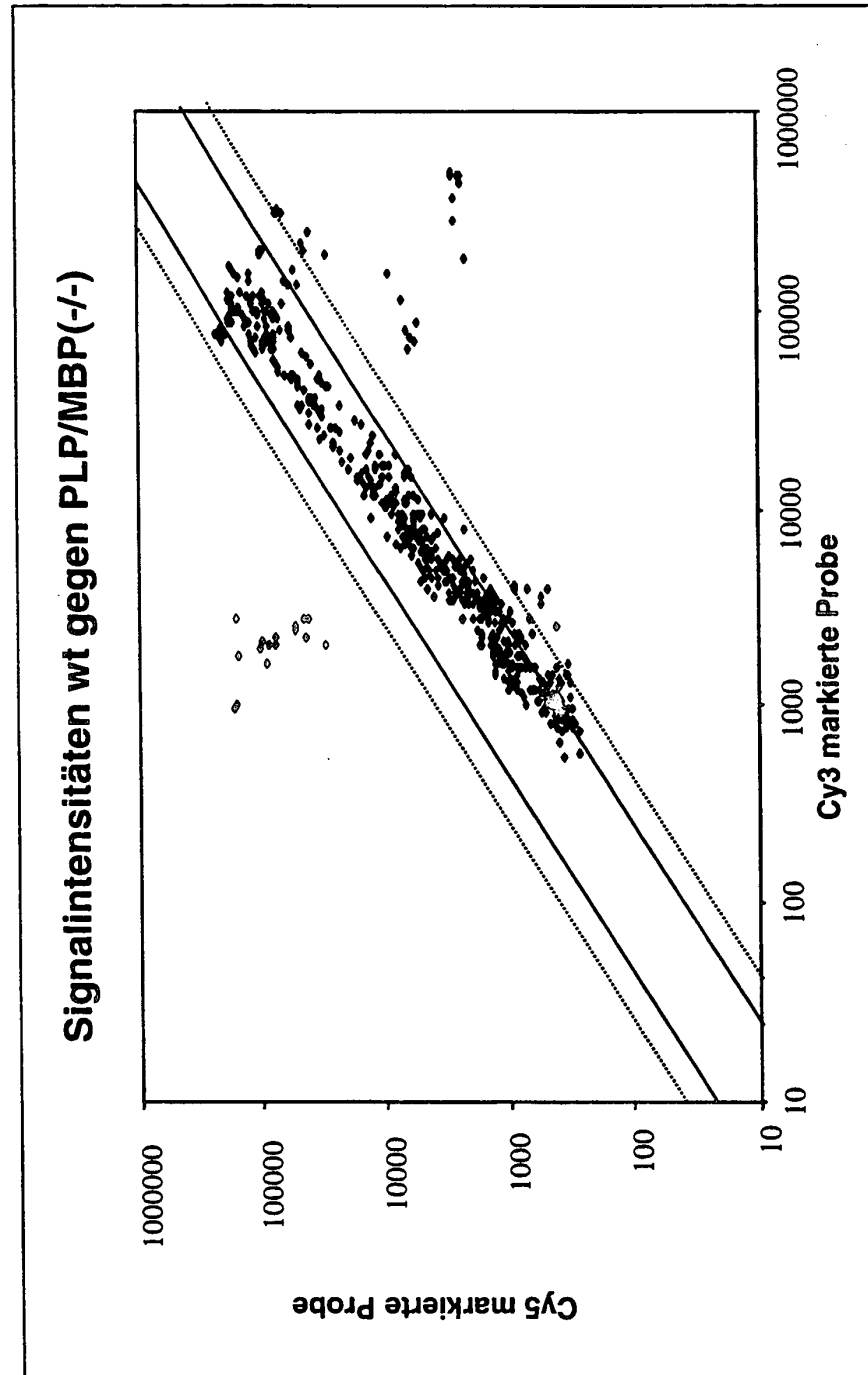


Figur 3b



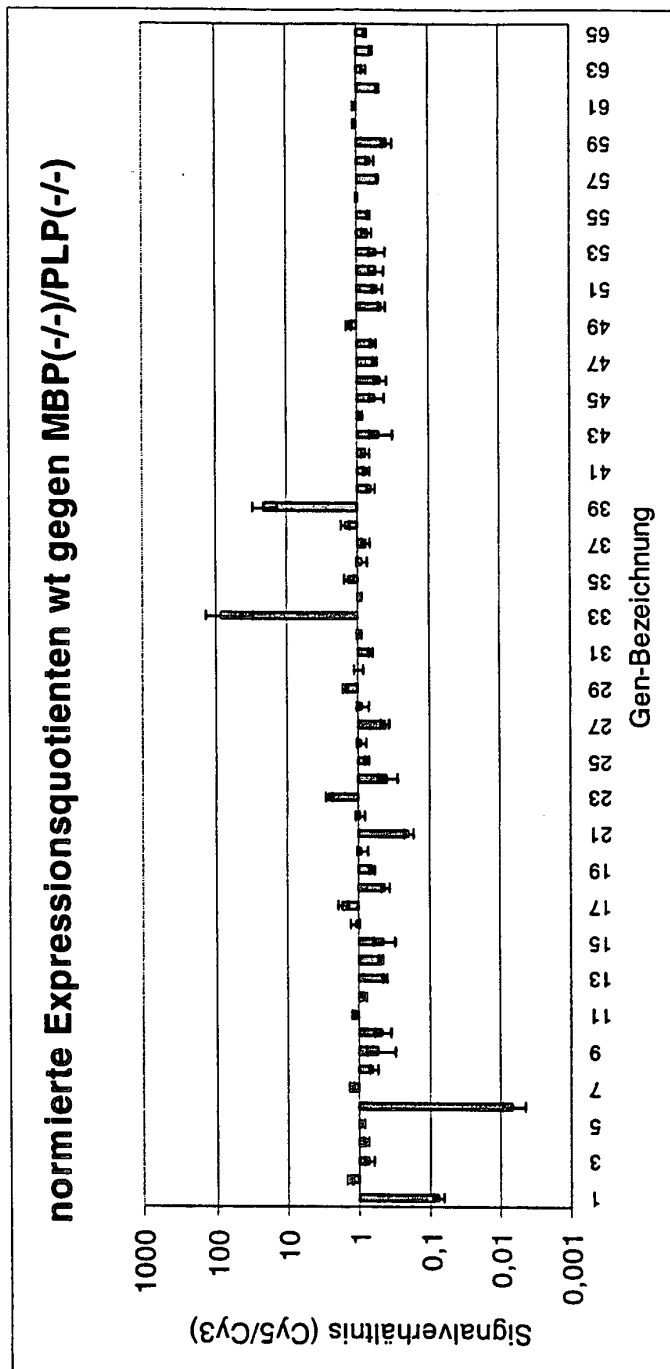
Figur 3a

THIS PAGE



Figur 3c

THIS PAGE BLANK (USPTO)



Figur 3d

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 99/04014

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 688 642 A (CALVERT JEFFREY M ET AL) 18 November 1997 (1997-11-18)	1,3-6,8
Y	the whole document	2,7,9-11
Y	US 5 622 826 A (VARMA RAJENDER S) 22 April 1997 (1997-04-22) the whole document	1-11
Y	US 4 695 392 A (JOSEPHSON LEE ET AL) 22 September 1987 (1987-09-22) column 12, line 33 - line 53	1-11
Y	US 5 683 875 A (LICHTENWALTER KAY) 4 November 1997 (1997-11-04) column 8, line 39 - line 67	1-11
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 October 1999

Date of mailing of the international search report

26/10/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hagenmaier, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/EP 99/04014

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>GUO Z ET AL: "DIRECT FLUORESCENCE ANALYSIS OF GENETIC POLYMORPHISMS BY HYBRIDIZATION WITH OLIGONUCLEOTIDE ARRAYS ON GLASS SUPPORTS" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 22, no. 24, 11 December 1994 (1994-12-11), pages 5456-5465, XP002006248 ISSN: 0305-1048 cited in the application the whole document</p> <p style="text-align: center;">----</p>	1-11
Y	<p>SCHEMA M: "GENOME ANALYSIS WITH GENE EXPRESSION MICROARRAYS" BIOESSAYS, vol. 18, no. 5, 1996, pages 427-431, XP002916033 ISSN: 0265-9247 the whole document</p> <p style="text-align: center;">----</p>	1-11
A	<p>SCHEMA M ET AL: "QUANTITATIVE MONITORING OF GENE EXPRESSION PATTERNS WITH A COMPLEMENTARY DNA MICROARRAY" SCIENCE, vol. 270, no. 5235, 20 October 1995 (1995-10-20), pages 467-470, XP000644675 ISSN: 0036-8075 the whole document</p> <p style="text-align: center;">----</p>	
A	<p>CHEE M ET AL: "ACCESSING GENETIC INFORMATION WITH HIGH-DENSITY DNA ARRAYS" SCIENCE, vol. 274, 25 October 1996 (1996-10-25), pages 610-614, XP002022508 the whole document</p> <p style="text-align: center;">----</p>	
A	<p>DATABASE MEDLINE 'Online! AN97051663, 1996 SURI AND MISHRA: "BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS (1996) 11 (12) 1199-205" XP002087613 ACTIVATING PIEZOELECTRIC CRYSTAL SURFACE BY SILANIZATION FOR MICROGRAVIMETRIC IMMUNOBIOSENSOR APPLICATION abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/04014

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5688642	A	18-11-1997	NONE	
US 5622826	A	22-04-1997	NONE	
US 4695392	A	22-09-1987	US 4554088 A	19-11-1985
			AT 70366 T	15-12-1991
			CA 1254028 A,C	16-05-1989
			DE 3485332 A	23-01-1992
			DK 237484 A	13-11-1984
			EP 0125995 A	21-11-1984
			EP 0357593 A	14-03-1990
			JP 2113602 C	06-12-1996
			JP 7006986 B	30-01-1995
			JP 60001564 A	07-01-1985
			JP 2683786 B	03-12-1997
			JP 8009995 A	16-01-1996
			WO 8806632 A	07-09-1988
			US 4628037 A	09-12-1986
			US 4695393 A	22-09-1987
			US 4698302 A	06-10-1987
			US 4672040 A	09-06-1987
US 5683875	A	04-11-1997	NONE	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/04014

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 688 642 A (CALVERT JEFFREY M ET AL) 18. November 1997 (1997-11-18)	1,3-6,8
Y	das ganze Dokument	2,7,9-11
Y	US 5 622 826 A (VARMA RAJENDER S) 22. April 1997 (1997-04-22)	1-11
Y	US 4 695 392 A (JOSEPHSON LEE ET AL) 22. September 1987 (1987-09-22) Spalte 12, Zeile 33 - Zeile 53	1-11
Y	US 5 683 875 A (LICHTENWALTER KAY) 4. November 1997 (1997-11-04) Spalte 8, Zeile 39 - Zeile 67	1-11
	--- -/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

19. Oktober 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

26/10/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hagenmaier, S

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>GUO Z ET AL: "DIRECT FLUORESCENCE ANALYSIS OF GENETIC POLYMORPHISMS BY HYBRIDIZATION WITH OLIGONUCLEOTIDE ARRAYS ON GLASS SUPPORTS"</p> <p>NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 22, Nr. 24, 11. Dezember 1994 (1994-12-11), Seiten 5456-5465, XP002006248 ISSN: 0305-1048 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-11
Y	<p>SCHEMA M: "GENOME ANALYSIS WITH GENE EXPRESSION MICROARRAYS"</p> <p>BIOESSAYS, Bd. 18, Nr. 5, 1996, Seiten 427-431, XP002916033 ISSN: 0265-9247 das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-11
A	<p>SCHEMA M ET AL: "QUANTITATIVE MONITORING OF GENE EXPRESSION PATTERNS WITH A COMPLEMENTARY DNA MICROARRAY"</p> <p>SCIENCE, Bd. 270, Nr. 5235, 20. Oktober 1995 (1995-10-20), Seiten 467-470, XP000644675 ISSN: 0036-8075 das ganze Dokument</p> <p>---</p>	
A	<p>CHEE M ET AL: "ACCESSING GENETIC INFORMATION WITH HIGH-DENSITY DNA ARRAYS"</p> <p>SCIENCE, Bd. 274, 25. Oktober 1996 (1996-10-25), Seiten 610-614, XP002022508 das ganze Dokument</p> <p>---</p>	
A	<p>DATABASE MEDLINE 'Online!'</p> <p>AN97051663, 1996</p> <p>SURI AND MISHRA: "BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS (1996) 11 (12) 1199-205"</p> <p>XP002087613</p> <p>ACTIVATING PIEZOELECTRIC CRYSTAL SURFACE BY SILANIZATION FOR MICROGRAVIMETRIC IMMUNOBIOSENSOR APPLICATION</p> <p>Zusammenfassung</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Int. .ionales Aktenzeichen

PCT/EP 99/04014

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5688642 A	18-11-1997	KEINE	
US 5622826 A	22-04-1997	KEINE	
US 4695392 A	22-09-1987	US 4554088 A	19-11-1985
		AT 70366 T	15-12-1991
		CA 1254028 A,C	16-05-1989
		DE 3485332 A	23-01-1992
		DK 237484 A	13-11-1984
		EP 0125995 A	21-11-1984
		EP 0357593 A	14-03-1990
		JP 2113602 C	06-12-1996
		JP 7006986 B	30-01-1995
		JP 60001564 A	07-01-1985
		JP 2683786 B	03-12-1997
		JP 8009995 A	16-01-1996
		WO 8806632 A	07-09-1988
		US 4628037 A	09-12-1986
		US 4695393 A	22-09-1987
		US 4698302 A	06-10-1987
		US 4672040 A	09-06-1987
US 5683875 A	04-11-1997	KEINE	

THIS PAGE BLANK (USPTO)